

## UTILISATION DES PROTEINES ET DES PEPTIDES CODES PAR LE GENOME D'UNE NOUVELLE SOUCHE CORONAVIRUS ASSOCIE AU SRAS

La présente invention est relative à une nouvelle souche de corona-  
virus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), issue d'un prélèvement  
répertorié sous le n° 031589 et prélevé à Hanoi (Vietnam), à des molécules d'acide  
nucléique issues de son génome, aux protéines et peptides codés par lesdites  
molécules d'acide nucléique ainsi qu'à leurs applications, notamment en tant que réac-  
tifs de diagnostic et/ou comme vaccin.

Le coronavirus est un virus à ARN monocaténaire, de polarité posi-  
tive, d'approximativement 30 kilobases qui se réplique dans le cytoplasme des cellules  
hôtes ; l'extrémité 5' du génome a une structure en coiffe et l'extrémité 3' comporte  
une queue polyA. Ce virus est enveloppé et comprend, à sa surface, des structures  
péplomériques dénommées spicules.

Le génome comprend les cadres ouverts de lecture ou ORF suivants,  
de son extrémité 5' vers son extrémité 3' : ORF1a et ORF1b correspondant aux  
protéines du complexe de transcription-réplication, et ORF-S, ORF-E, ORF-M et  
ORF-N correspondant aux protéines structurales S, E, M et N. Il comprend également  
des ORFs correspondant à des protéines de fonction inconnue codées par : la région  
située entre l'ORF-S et l'ORF-E et chevauchant cette dernière, la région située entre  
l'ORF-M et l'ORF-N, et la région incluse dans l'ORF-N.

La protéine S est une glycoprotéine membranaire (200-220 kDa) qui  
se présente sous la forme de spicules ou "Spike" émergeant de la surface de  
l'enveloppe virale. Elle est responsable de l'attachement du virus aux récepteurs de la  
cellule hôte et de l'induction de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane  
cellulaire.

La petite protéine d'enveloppe (E) également dénommée sM (*small membrane*) qui est une protéine trans-membranaire non glycosylée d'environ 10 kDa,  
est la protéine présente en plus faible quantité dans le virion. Elle joue un rôle moteur  
dans le processus de bourgeonnement des coronavirus qui se produit au niveau du  
compartiment intermédiaire dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi

La protéine M ou protéine de matrice (25-30 kDa) est une glycoprotéine membranaire plus abondante qui est intégrée dans la particule virale par une interaction M/E, tandis que l'incorporation de S dans les particules est dirigée par une interaction S/M. Elle semble être importante pour la maturation virale des coronavirus et pour la détermination du site au niveau duquel les particules virales sont assemblées.

La protéine N ou protéine de nucléocapside (45-50 kDa) qui est la plus conservée parmi les protéines structurales des coronavirus, est nécessaire pour encapsider l'ARN génomique puis pour diriger son incorporation dans le virion. Cette protéine est vraisemblablement également impliquée dans la réplication de l'ARN.

Lorsqu'une cellule hôte est infectée, le cadre de lecture (ORF) situé en 5' du génome viral est traduit en une polyprotéine qui est clivée par les protéases virales et libère alors plusieurs protéines non-structurales telles que l'ARN-polymérase ARN dépendante (Rep) et l'ATPase hélicase (Hel). Ces deux protéines sont impliquées dans la réplication du génome viral ainsi que dans la génération de transcrits qui sont utilisés dans la synthèse des protéines virales. Les mécanismes par lesquels ces ARNms sub-génomiques sont produits, ne sont pas complètement compris ; cependant des faits récents indiquent que les séquences de régulation de la transcription à l'extrémité 5' de chaque gène représentent des signaux qui régulent la transcription discontinue des ARNms sub-génomiques.

Les protéines de la membrane virale (protéines S, E et M) sont insérées dans le compartiment intermédiaire, alors que l'ARN répliqué (brin +) s'assemble avec la protéine N (nucléocapside). Ce complexe protéine-ARN s'associe ensuite avec la protéine M incluse dans les membranes du réticulum endoplasmique et les particules virales se forment lorsque le complexe de la nucléocapside bourgeonne dans le réticulum endoplasmique. Le virus migre ensuite à travers le complexe du Golgi et éventuellement sort de la cellule, par exemple par exocytose. Le site de l'attachement du virus à la cellule hôte se trouve au niveau de la protéine S.

Les coronavirus sont responsables de 15 à 30 % des rhumes chez l'Homme et d'infections respiratoires ou digestives chez les animaux, notamment le chat (FIPV : *Feline infectious peritonitis virus*), la volaille (IBV : *Avian Infectious bronchitis virus*), la souris (MHV : *Mouse Hepatitis virus*), le porc (TGEV :

Transmissible gastroenteritis virus, PEDV : *Porcine Epidemic Diarrhea virus*, PRCoV : *Porcine Respiratory Coronavirus*, HEV : *Hemagglutinating encephalomyelitis Virus*) et les bovins (BcoV : *Bovine coronavirus*).

En général, chaque coronavirus n'affecte qu'une seule espèce ; chez  
5 les individus immunocompétents, l'infection induit des anticorps éventuellement neutralisants et une immunité cellulaire, capables de détruire les cellules infectées.

Une épidémie de pneumonie atypique, dénommée syndrome respiratoire aigu sévère (SARS ou *Severe acute respiratory syndrome*, SRAS en français) s'est propagée dans différents pays (Vietnam, Hong-Kong, Singapour, Thaïlande et  
10 Canada) au cours du premier trimestre 2003, à partir d'un foyer initial apparu en Chine dans le dernier trimestre de 2002. La sévérité de cette maladie est telle que son taux de mortalité est d'environ 3 à 6 %. La détermination de l'agent causatif de cette maladie a été entreprise par de nombreux laboratoires, à travers le monde.

En mars 2003, un nouveau coronavirus (SARS-CoV, SARS virus ou  
15 virus SRAS, en français) a été isolé, en association avec des cas de syndrome respiratoire aigu sévère (T.G.KSIAZEK et al., The New England Journal of Medicine, 2003, 348, 1319-1330 ; C. DROSTEN et al., The New England Journal of Medicine, 2003, 348, 1967-1976 ; Peiris et al., Lancet, 2003, 361, 1319-).

Des séquences génomiques de ce nouveau coronavirus ont ainsi été  
20 obtenues, notamment celles de l'isolat Urbani (Genbank n° d'accès AY274119.3 et A. MARRA et al., Science, May 1, 2003, 300, 1399-1404) et de l'isolat de Toronto (Tor2, Genbank n° d'accès AY 278741 et A. ROTA et al., Science, 2003, 300, 1394-1399).

L'organisation du génome est comparable à celle des autres corona-  
25 virus connus permettant ainsi de confirmer l'appartenance du SARS-CoV à la famille des *Coronaviridae* ; les cadres ouverts de lecture ORF1a et 1b et les cadres ouverts de lecture correspondant aux protéines S, E, M, et N, ainsi qu'à des protéines codées par : la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E (ORF3), la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E et chevauchant l'ORF-E (ORF4), la région située entre l'ORF-M et l'ORF-N  
30 (ORF7 à ORF11) et la région correspondant à l'ORF-N (ORF13 et ORF14), ont notamment été identifiées.

Sept différences ont été mises en évidence entre les séquences des isolats Tor2 et Urbani ; 3 correspondent à des mutations silencieuses (c/t en position 16622 et a/g en position 19064 de l'ORF1b, t/c en position 24872 de l'ORF-S) et 4 modifient la séquence en acides aminés de respectivement : les protéines codées par l'ORF1a (c/t en position 7919 correspondant à la mutation A/V), la protéine S (g/t en position 23220 correspondant à la mutation A/S), la protéine codée par l'ORF3 (a/g en position 25298 correspondant à la mutation R/G) et de la protéine M (t/c en position 26857 correspondant à la mutation S/P).

En outre, l'analyse phylogénétique montre que le SARS-CoV est éloigné des autres coronavirus et qu'il est apparu, ni par mutation de coronavirus respiratoires humains, ni par recombinaison entre des coronavirus connus (pour une revue, voir Holmes, J.C.I., 2003, 111, 1605-1609).

La mise en évidence et la prise en compte de nouveaux variants sont importantes pour la mise au point de réactifs de détection et de diagnostic du SRAS suffisamment sensibles et spécifiques ainsi qu'à des compositions immunogènes aptes à protéger des populations contre des épidémies de SRAS.

Les Inventeurs ont maintenant mis en évidence une autre souche de coronavirus associé au SRAS, qui se distingue des isolats Tor2 et Urbani.

La présente invention a donc pour objet, une souche isolée ou purifiée de coronavirus humain associé au syndrome respiratoire aigu sévère, caractérisée en ce que son génome présente sous la forme d'ADN complémentaire un codon sérine en position 23220-23222 du gène de la protéine S ou un codon glycine en position 25298-25300 du gène de l'ORF3, et un codon alanine en position 7918-7920 de l'ORF1a ou un codon sérine en position 26857-26859 du gène de la protéine M, lesdites positions étant indiquées en référence à la séquence Genbank AY274119.3.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite souche, l'équivalent ADN de son génome présente une séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 1 ; cette souche de coronavirus est issue du prélèvement de lavage bronchoalvéolaire d'un patient atteint de SRAS, répertorié sous le n° 031589 et effectué à l'hôpital français de Hanoi (Vietnam).



Conformément à l'invention, ladite séquence SEQ ID NO :1 est celle de l'acide désoxyribonucléique correspondant à la molécule d'acide ribonucléique du génome de la souche isolée de coronavirus telle que définie ci-dessus.

La séquence SEQ ID NO : 1 se distingue de la séquence Genbank  
5 AY274119.3 (isolat Tor2) en ce qu'elle possède les mutations suivantes :

- g/t en position 23220 ; le codon alanine (gct) en position 577 de la séquence en acides aminés de la protéine S de Tor2 est remplacé par un codon sérine (tct),

- a/g en position 25298 ; le codon arginine (aga) en position 11 de la  
10 séquence en acide aminés de la protéine codée par l'ORF3 de Tor 2 est remplacé par un codon glycine (gga).

En outre, la séquence SEQ ID NO : 1 se distingue de la séquence Genbank AY278741 (isolat Urbani) en ce qu'elle possède les mutations suivantes :

- t/c en position 7919 ; le codon valine (gtt) en position 2552 de la  
15 séquence en acides aminés de la protéine codée par l'ORF1a est remplacé par un codon alanine (gct),

- t/c en position 16622 : cette mutation ne modifie pas la séquence en acides aminés des protéines codées par l'ORF1b (mutation silencieuse),

- g/a en position 19064 : cette mutation ne modifie pas la séquence  
20 en acides aminés des protéines codées par l'ORF1b (mutation silencieuse),

- c/t en position 24872 : cette mutation ne modifie pas la séquence en acides aminés de la protéine S, et

- c/t en position 26857 : le codon proline (ccc) en position 154 de la séquence en acides aminés de la protéine M est remplacé par un codon sérine (tcc).

25 En l'absence de mention particulière, les positions des séquences nucléotidiques et peptidiques sont indiquées en référence à la séquence Genbank AY274119.3.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide isolé ou purifié, caractérisé en ce que sa séquence est celle du génome de la souche isolée  
30 de coronavirus telle que définie ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit polynucléotide il présente la séquence SEQ ID NO : 1.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide isolé ou purifié, caractérisé en ce que sa séquence hybride dans des conditions de forte stringence avec la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus.

Les termes « isolé ou purifié » signifient modifié « par la main de l'homme » à partir de l'état naturel ; autrement dit si un objet existe dans la nature, il est dit isolé ou purifié s'il a été modifié ou extrait de son environnement naturel ou les deux. Par exemple, un polynucléotide ou une protéine/un peptide naturellement présent dans un organisme vivant n'est ni isolé, ni purifié ; en revanche le même polynucléotide ou protéine /peptide séparé des molécules coexistantes dans son environnement naturel, obtenu par clonage, amplification et/ou synthèse chimique est isolé au sens de la présente invention. De plus, un polynucléotide ou une protéine/peptide qui est introduit dans un organisme par transformation, manipulation génétique ou par toute autre méthode, est « isolé » même s'il est présent dans ledit organisme. Le terme purifié tel qu'utilisé dans la présente invention, signifie que les protéines /peptides selon l'invention sont essentiellement libres d'association avec les autres protéines ou polypeptides, comme l'est par exemple le produit purifié de la culture de cellules hôtes recombinantes ou le produit purifié à partir d'une source non-recombinante.

Au sens de la présente invention, on entend par conditions d'hybridation de forte stringence, des conditions de température et de force ionique choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation spécifique et sélective entre polynucléotides complémentaires.

A titre d'illustration, des conditions de forte stringence aux fins de définir les polynucléotides ci-dessus, sont avantageusement les suivantes : l'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation pendant 20 heures à 42°C suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C.

La présente invention a également pour objet un fragment représen-

tatif du polynucléotide tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu, soit par l'utilisation d'enzymes de restriction dont les sites de reconnaissance et de coupure sont présents dans ledit polynucléotide tel que défini ci-dessus, soit par amplification à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques dudit  
5 polynucléotide tel que défini ci-dessus, soit par transcription *in vitro*, soit par synthèse chimique.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment, il est sélectionné dans le groupe constitué par : l'ADNc correspondant à au moins un cadre ouvert de lecture (ORF) choisi parmi : ORF1a, ORF1b, ORF-S, ORF-E, ORF-M,  
10 ORF-N, ORF3, ORF4, ORF7 à ORF11, ORF13 et ORF14, et l'ADNc correspondant aux extrémités 5' ou 3' non-codantes dudit polynucléotide.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit fragment présente une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les séquences SEQ ID NO : 2 et 4 représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-S qui code pour la protéine S,  
15
- les séquences SEQ ID NO : 13 et 15 représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-E qui code pour la protéine E,
- les séquences séquence SEQ ID NO : 16 et 18 représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-M qui code pour la protéine M,  
20
- les séquences SEQ ID NO : 36 et 38 représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-N qui code pour la protéine N,
- les séquences représentant les ADNc correspondant respectivement : aux ORF1a et ORF1b (ORF1ab, SEQ ID NO : 31), aux ORF3 et ORF4 (SEQ ID NO : 7, 8), aux ORF 7 à 11 (SEQ ID NO : 19, 20), à l'ORF13 (SEQ ID NO : 32) et  
25 à l'ORF14 (SEQ ID NO : 34), et
- les séquences représentant les ADNc correspondant respectivement aux extrémités 5'(SEQ ID NO : 39 et 72) et 3' non-codantes (SEQ ID NO : 40, 73) dudit polynucléotide.

La présente invention a également pour objet un fragment de  
30 l'ADNc codant pour la protéine S, tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il présente une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 5 et 6 (fragments Sa et Sb).

La présente invention a également pour objet un fragment de l'ADNc correspondant aux ORF1a et ORF1b tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il présente une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 41 à 54 (fragments L0 à L12).

5 La présente invention a également pour objet un fragment du polynucléotide tel que défini ci dessus, caractérisé en ce qu'il présente au moins 15 bases ou paires de bases consécutives de la séquence du génome de ladite souche incluant au moins une de celles situées en position 7979, 16622, 19064, 23220, 24872, 25298 et 26857. De préférence, il s'agit d'un fragment de 20 à 2500 bases ou paires de bases,  
10 de manière préférée de 20 à 400.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment, il inclut au moins un couple de bases ou de paires de bases correspondant aux positions suivantes : 7919 et 23220, 7919 et 25298, 16622 et 23220, 19064 et 23220, 16622 et 25298, 19064 et 25298, 23220 et 24872, 23220 et 26857, 24872 et 25298, 25298 et  
15 26857.

La présente invention a également pour objet des amorces d'au moins 18 bases aptes à amplifier un fragment du génome d'un coronavirus associé au SRAS ou de l'équivalent ADN de celui-ci.

Selon un mode de réalisation desdites amorces, elles sont sélection-  
20 nées dans le groupe constitué par :

- la paire d'amorces n° 1 correspondant respectivement aux positions 28507 à 28522 (amorce sens, SEQ ID NO : 60) et 28774 à 28759 (amorce anti-sens, SEQ ID NO : 61) de la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus,
- la paire d'amorces n° 2 correspondant respectivement aux positions  
25 28375 à 28390 (amorce sens, SEQ ID NO : 62) et 28702 à 28687 (amorce anti-sens, SEQ ID NO : 63) de la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus., et
- la paire d'amorces constituée des amorces SEQ ID Nos 55 et 56.

La présente invention a également pour objet une sonde apte à détecter la présence du génome d'un coronavirus associé au SRAS ou d'un fragment  
30 de celui-ci, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par : les fragments tels que définis ci-dessus et les fragments correspondant aux positions

suivantes de la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus : 28561 à 28586, 28588 à 28608, 28541 à 28563 et 28565 à 28589 (SEQ ID NO : 64 à 67).

Les sondes et amorces selon l'Invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'Homme du Métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{33}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$ , le  $^3\text{H}$  ou l' $^{125}\text{I}$ . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels que la biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

L'invention englobe les sondes et les amorces marquées dérivées des séquences précédentes.

De telles sondes et amorces sont utiles pour le diagnostic de l'infection par un coronavirus associé au SRAS.

La présente invention a également pour objet une méthode de détection d'un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, laquelle méthode est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

(a) l'extraction d'acides nucléiques présents dans ledit échantillon biologique,

(b) l'amplification d'un fragment de l'ORF-N par RT-PCR à l'aide d'une paire d'amorces telle que définie ci-dessus, et

(c) la détection par tout moyen approprié des produits d'amplifications obtenus en (b).

Les produits d'amplifications (amplicons) en (b) sont de 268 pb pour la paire d'amorces n° 1 et de 328 pb pour la paire d'amorces n°2.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, l'étape (b) de détection est réalisée à l'aide d'au moins une sonde correspondant aux positions 28561 à 28586, 28588 à 28608, 28541 à 28563 et 28565 à 28589 de la séquence du polynucléotide tel que défini ci-dessus.

De préférence, le génome du coronavirus associé au SRAS est détecté et éventuellement quantifié par PCR en temps réel, à l'aide de la paire

d'amorces n°2 et des sondes correspondant aux positions 28541 à 28563 et 28565 à 28589 marquées avec des composés différents, notamment des agents fluorescents différents.

La RT-PCR en temps réel qui met en œuvre cette paire d'amorces et  
5 cette sonde est très sensible puisqu'elle permet de détecter  $10^2$  copies d'ARN et jusqu'à 10 copies d'ARN, elle est en outre fiable et reproductible.

L'invention englobe les polydésoxyribonucléotides et les polyribo-  
nucléotides simple-brin, double-brin et tripe-brin correspondant à la séquence du  
génome de la souche isolée de coronavirus et de ses fragments tels que définis ci-  
10 dessus, ainsi qu'à leurs séquences complémentaires, sens ou anti-sens, notamment les  
ARN et les ADNc correspondant à la séquence du génome et de ses fragments tels que  
définis ci-dessus.

La présente invention englobe également les fragments  
d'amplification obtenus à l'aide d'amorces spécifiques du génome de la souche puri-  
15 fiée ou isolée tel que défini ci-dessus, notamment à l'aide d'amorces et de paires  
d'amorces telles que définies ci-dessus, les fragments de restriction constitués par ou  
comprenant la séquence des fragments tels que définis ci-dessus, les fragments obte-  
nus par transcription *in vitro* à partir d'un vecteur contenant la séquence SEQ ID NO :  
1 ou un fragment tel que défini ci-dessus, ainsi que des fragments obtenus par  
20 synthèse chimique. Des exemples de fragments de restriction sont déduits de la carte  
de restriction de la séquence SEQ ID NO : 1 illustrée par la figure 13. Conformément  
à l'invention lesdits fragments sont, soit sous forme de fragments isolés, soit sous  
forme de mélanges de fragments. L'invention englobe également les fragments modi-  
fiés, par rapport aux précédents, par enlèvement, ou addition de nucléotides dans une  
25 proportion d'environ 15 %, par rapport à la longueur des fragments ci-dessus et/ou  
modifiés au niveau de la nature des nucléotides, dès lors que les fragments nucléo-  
tidiques modifiés conservent une capacité d'hybridation avec les séquences d'ARN  
génomiques ou antigénomiques de l'isolat tel que défini ci-dessus.

Les molécules d'acide nucléique selon l'invention sont obtenues par  
30 les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards  
tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M.  
AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). Par exemple, elles

peuvent être obtenues par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR ou bien par synthèse chimique totale ou partielle.

La présente invention a également pour objet une puce ou filtre à ADN ou à ARN, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polynucléotide ou l'un  
5 de ses fragments tels que définis ci-dessus.

Les puces ou filtres à ADN ou à ARN selon l'invention sont préparés par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, comme par exemple greffage chimique ou électrochimique d'oligonucléotides sur support de verre ou de nylon.

10 La présente invention a également pour objet un vecteur de clonage et/ou d'expression recombinant, notamment un plasmide, un virus, un vecteur viral ou un phage comprenant un fragment d'acide nucléique tel que défini ci-dessus. De préférence, ledit vecteur recombinant est un vecteur d'expression dans lequel ledit fragment d'acide nucléique est placé sous le contrôle d'éléments régulateurs de la  
15 transcription et de la traduction appropriés. En outre, ledit vecteur peut comprendre des séquences (étiquettes ou *tag*) fusionnées en phase avec l'extrémité 5' et/ou 3' dudit insert, utiles pour l'immobilisation, et/ou la détection et/ou la purification de la protéine exprimée à partir dudit vecteur.

Ces vecteurs sont construits et introduits dans des cellules hôtes par  
20 les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues en elles-mêmes. De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple réplication de la séquence d'intérêt, expres-  
25 sion de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte.

Conformément à l'invention, ledit plasmide est notamment sélectionné parmi les plasmides suivants :

30 - le plasmide, dénommé SARS-S, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3059, le 20 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il

contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 21406 à 25348 (SEQ ID NO : 4), en référence à la séquence Genbank AY274119.3,

5                   - le plasmide, dénommé SARS-S1, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3020, le 12 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient un fragment 5' de la séquence d'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, lequel fragment correspondant aux nucléotides des positions 21406 à 23454 (SEQ ID NO :5), en référence à la séquence Genbank AY274119.3 Tor2,

10                   - le plasmide, dénommé SARS-S2, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3019, le 12 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient un fragment 3' de la séquence d'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, lequel fragment correspondant aux nucléotides des positions 23322 à 25348 (SEQ ID NO :6), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,

20                   - le plasmide, dénommé SARS-SE, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3126, le, 13 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15; il contient l'ADNc correspondant à la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E et chevauchant l'ORF-E de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle région correspondant aux nucléotides des positions 25110 à 26244 (SEQ ID NO :8), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,

25                   - le plasmide, dénommé SARS-E, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3046, le 28 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine E de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle



séquence correspondant aux nucléotides des positions 26082 à 26413 (SEQ ID NO :15), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,

- le plasmide, dénommé SARS-M ; compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3047, le 28 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine M de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus ; laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26330 à 27098 (SEQ ID NO :18), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,

10 - le plasmide dénommé SARS-MN, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3125, le 13 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc correspondant à la région située entre l'ORF-M et l'ORF-N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589 et prélevée à Hanoi, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26977 à 28218 (SEQ ID NO :20), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,

- le plasmide dénommé SARS-N, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3048, le 5 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient l'ADNc codant pour la protéine N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 28054 à 29430 (SEQ ID NO :38), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3 ; ainsi ce plasmide comprend un insert de séquence SEQ ID NO :38 et est compris dans une souche bactérienne qui et qu'il a été déposée sous le n° I-3048, le 5 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15,

- le plasmide dénommé SARS-5'NC, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I- 3124, le 7 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient l'ADNc correspondant à l'extrémité 5'non codante du génome

de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 1 à 204 (SEQ ID NO :39), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,

- le plasmide dénommé SARS-3'NC, compris dans la souche bactérienne déposée sous le n° I-3123 le 7 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15. ; il contient la séquence d'ADNc correspondant à l'extrémité 3' non codante du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant à celle située entre le nucléotide en position 28933 à 29727 (SEQ ID NO :40), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3, se termine par une série de nucléotides a.,
- le plasmide d'expression dénommé pIV2.3N, contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion C-terminale de la protéine N (SEQ ID NO : 37) avec une étiquette polyhistidine,
- le plasmide d'expression dénommé pIV2.3S<sub>C</sub>, contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion C-terminale du fragment correspondant aux positions 475 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine,
- le plasmide d'expression pIV2.3S<sub>L</sub>, contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion C-terminale du fragment correspondant aux positions 14 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine,
- le plasmide d'expression dénommé pIV2.4N, contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion N-terminale de la protéine N (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine,
- le plasmide d'expression dénommé pIV2.4S<sub>C</sub> ou pIV2.4S<sub>1</sub>, contenant un insert codant pour une fusion N-terminale du fragment correspondant aux positions 475 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine, et
- le plasmide d'expression dénommé pIV2.4S<sub>L</sub> contenant un fragment d'ADNc codant pour une fusion N-terminale du fragment correspondant aux

positions 14 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S (SEQ ID NO : 3) avec une étiquette polyhistidine.

Selon une disposition avantageuse du plasmide d'expression tel que défini ci-dessus, il est compris dans une souche bactérienne qui a été déposée sous le  
5 n° I- 3117, le 23 octobre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

Selon une autre disposition avantageuse du plasmide d'expression tel que défini ci-dessus, il est compris dans une souche bactérienne qui a été déposée sous le n° I- 3118, le 23 octobre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures  
10 de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

Selon une autre disposition du plasmide d'expression tel que défini ci-dessus, il est compris dans une souche bactérienne qui a été déposée à la CNCM, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 sous les numéros suivants :

- a) souche n° I- 3118, déposée le 23 octobre 2003,
- 15 b) souche n° I- 3019, déposée le 12 mai 2003,
- c) souche n° I- 3020, déposée le 12 mai 2003,
- d) souche n° I-3059, déposée le 20 juin 2003,
- e) souche n° I-3323, déposée le 22 novembre 2004,
- f) souche n° I-3324, déposée le 22 novembre 2004,
- 20 g) souche n° I-3326, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,
- h) souche n° I-3327, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,
- i) souche n° I-3332, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,
- j) souche n° I-3333, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,
- k) souche n° I-3334, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,
- 25 l) souche n° I-3335, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,
- m) souche n° I-3336, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,
- n) souche n° I-3337, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,
- o) souche n° I-3338, déposée le 2 décembre 2004,
- p) souche n° I-3339, déposée le 2 décembre 2004,
- 30 q) souche n° I-3340, déposée le 2 décembre 2004,
- r) souche n° I-3341, déposée le 2 décembre 2004.

La présente invention a également pour objet un insérat d'acide nucléique d'origine virale, caractérisé en ce qu'il est contenu dans l'une quelconque des souches telles que définies ci-dessus en a)-r).

5 La présente invention a également pour objet un acide nucléique comportant un gène synthétique permettant une expression optimisée de la protéine S dans des cellules eucaryotes, caractérisé en ce qu'il possède la séquence SEQ ID NO: 140.

La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression comportant un acide nucléique comportant un gène synthétique permettant une expression optimisée de la protéine S, lequel vecteur est contenu dans la  
10 souche bactérienne déposée à la CNCM, le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous le n°I-3333.

Selon un mode de réalisation dudit vecteur d'expression, il s'agit d'un vecteur viral, sous forme de particule virale ou sous forme de génome recombinant.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, il s'agit  
15 d'une particule virale recombinante ou d'un génome viral recombinant susceptible d'être obtenu par transfection d'un plasmide selon les alinéas g), h) et k) à r) tels que définis ci-dessus, dans un système cellulaire approprié, c'est-à-dire, par exemple, des cellules transfectées avec un ou plusieurs autres plasmide(s), destinés à trancomplémenter certaines fonctions du virus délétées dans le vecteur et nécessaires à la formation des particules virales.  
20

On entend ici par « famille de la protéine S » la protéine S complète, son ectodomaine et des fragments de cet ectodomaine qui sont de préférence produits dans un système eucaryote.

La présente invention a également pour objet un vecteur lentiviral  
25 codant pour un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un virus rougeole recombinant codant pour un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un virus vaccine  
30 recombinant codant pour un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un vecteur selon les alinéas e) à r) tels que définis ci-dessus, ou d'un vecteur comportant un gène synthétique de la protéine S, tel que défini ci-dessus, pour la production, en système eucaryote, de la protéine S du coronavirus associé au SRAS, ou d'un fragment  
5 de cette protéine.

La présente invention a également pour objet une méthode de production de la protéine S en système eucaryote, comportant une étape de transfection de cellules eucaryotes en culture par un vecteur choisi parmi les vecteurs contenus dans les souches bactériennes mentionnées aux alinéas e) à r) ci-dessus ou un vecteur  
10 comportant un gène synthétique permettant une expression optimisée de la protéine S.

La présente invention a également pour objet une banque d'ADNc caractérisée en ce qu'elle comprend des fragments tels que définis ci-dessus, en particulier des fragments d'amplification ou des fragments de restriction, clonés dans un vecteur recombinant, notamment un vecteur d'expression (banque d'expression).

La présente invention a également pour objet des cellules, notamment des cellules procaryotes, modifiées par un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.  
15

La présente invention a également pour objet une cellule eucaryote génétiquement modifiée exprimant une protéine ou un polypeptide tels que définis ci-après. Bien évidemment, les termes "cellule eucaryote génétiquement modifiée" ne désignent pas une cellule modifiée par un virus sauvage.  
20

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite cellule, elle est susceptible d'être obtenue par transfection par l'un quelconque des vecteurs mentionnés aux alinéas k) à n) ci-dessus.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, il s'agit de la cellule FRhK4-Ssol-30, déposée à la CNCM le 22 novembre 2004, sous le n°I-3325.  
25

Les vecteurs recombinants tels que définis ci-dessus et les cellules transformées par lesdits vecteurs d'expression sont avantageusement utilisés pour la production des protéines et des peptides correspondants. Les banques d'expression  
30 dérivées desdits vecteurs, ainsi que les cellules transformées par lesdites banques

d'expression sont avantageusement utilisées pour identifier les épitopes immunogènes (épitopes B et T) des protéines du coronavirus associé au SRAS.

La présente invention a également pour objet les protéines et les peptides purifiées ou isolées, caractérisés en ce qu'ils sont codés par le polynucléotide  
5 ou l'un de ses fragments tels que définis ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite protéine est sélectionnée dans le groupe constitué par :

- la protéine S de séquence SEQ ID NO :3 ou son ectodomaine
- la protéine E de séquence SEQ ID NO :14
- 10 - la protéine M de séquence SEQ ID NO :17
- la protéine N de séquence SEQ ID NO : 37
- les protéines codées par les ORFs : ORF1a, ORF1b, ORF3, ORF4 et ORF7 à ORF11, ORF13 et ORF14 de séquence respectivement, SEQ ID NO :74, 75, 10, 12, 22, 24, 26, 28, 30, 33 et 35.

15 On utilisera ci-après indifféremment les termes « ectodomaine de la protéine S » et « forme soluble de la protéine S ».

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit peptide est constitué des acides aminés correspondant aux positions 1 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S

20 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit peptide est sélectionné dans le groupe constitué par :

- a) les peptides correspondant aux positions 14 à 1193 et 475 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S,
- b) les peptides correspondant aux positions 2 à 14 (SEQ ID NO : 69)  
25 et 100 à 221 de la séquence en acides aminés de la protéine M ; ces peptides correspondent respectivement à l'ectodomaine et à l'endodomaine de la protéine M, et
- c) les peptides correspondant aux positions 1 à 12 (SEQ ID NO : 70) et 53 à 76 (SEQ ID NO : 71) de la séquence en acides aminés de la protéine E ; ces peptides correspondent respectivement à l'ectodomaine et à l'extrémité C-terminale de  
30 la protéine E, et

d) les peptides de 5 à 50 acides aminés consécutifs, de préférence de 10 à 30 acides aminés, inclus ou chevauchant partiellement ou totalement la séquence des peptides tels que définis en a), b) ou c).

La présente invention a également pour objet un peptide caractérisé en ce qu'il présente une séquence de 7 à 50 acides aminés incluant un résidu d'acide aminé sélectionné dans le groupe constitué par :

- l'alanine située en position 2552 de la séquence en acides aminés de la protéine codée par l'ORF1a.
- la sérine située en position 577 de la séquence en acides aminés de la protéine S de la souche de SARS-CoV telle que définie ci-dessus,
- la glycine en position 11 de la séquence en acides aminés de la protéine codée par l'ORF3 de la souche de SARS-CoV telle que définie ci-dessus,
- la sérine en position 154 de la séquence en acides aminés de la protéine M de la souche de SARS-CoV telle que définie ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un anticorps ou un fragment d'anticorps polyclonal ou monoclonal, susceptible d'être obtenu par immunisation d'un animal avec un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus, une banque d'ADNc telle que définie ci-dessus ou bien une protéine ou un peptide tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il se lie avec l'une au moins des protéines codées par le SARS-CoV telles que définies ci-dessus.

L'invention englobe les anticorps polyclonaux, les anticorps monoclonaux, les anticorps chimériques tels que les anticorps humanisés, ainsi que leurs fragments (Fab, Fv, scFv).

La présente invention a également pour objet un hybridome produisant un anticorps monoclonal contre la protéine N, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les hybridomes suivants :

- l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal 87, déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004 sous le numéro I-3328,
- l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal 86, déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004 sous le numéro I-3329,
- l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal 57, déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004 sous le numéro I-3330, et

- l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal 156, déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004 sous le numéro I-3331.

La présente invention a également pour objet un anticorps ou fragment d'anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre la protéine N, caractérisé en ce qu'il est produit par un hybridome tel que défini ci-dessus.

Au sens de la présente invention, on entend par anticorps chimérique, relativement à un anticorps d'une espèce animale particulière ou d'une classe particulière d'anticorps, un anticorps comprenant tout ou partie d'une chaîne lourde et/ou d'une chaîne légère d'un anticorps d'une autre espèce animale ou d'une autre classe d'anticorps.

Au sens de la présente invention, on entend par anticorps humanisé une immunoglobuline humaine dans laquelle les résidus des CDRs (*Complementary-Determining Regions*) qui forment le site de liaison à l'antigène sont remplacés par ceux d'un anticorps monoclonal non-humain possédant la spécificité, l'affinité ou l'activité recherchées. Par comparaison avec les anticorps non-humains, les anticorps humanisés sont moins immunogènes et possèdent une demi-vie prolongée chez l'Homme car ils ne possèdent qu'une faible proportion de séquences non-humaines étant donné que la quasi-totalité des résidus des régions FR (Framework) et de la région constante (Fc) de ces anticorps sont ceux d'une séquence consensus d'immunoglobulines humaines.

La présente invention a également pour objet une puce ou filtre à protéine, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine, un peptide ou bien un anticorps tels que définis ci-dessus.

Les puces à protéine selon l'invention sont préparées par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes. Parmi les supports appropriés sur lesquels peuvent être immobilisés des protéines, on peut citer ceux en matière plastique ou en verre, notamment sous la forme de microplaques.

La présente invention a également pour objet des réactifs dérivés de la souche isolée de coronavirus associé au SRAS, issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, utiles pour l'étude et le diagnostic de l'infection provoquée par un coronavirus associé au SRAS, lesquels réactifs sont sélectionnés dans le groupe constitué par :



(a) une paire d'amorces, une sonde ou une puce à ADN telles que définies ci-dessus,

(b) un vecteur recombinant ou une cellule modifiée tels que définis ci-dessus,

5 (c) une souche isolée de coronavirus ou un polynucléotide tels que définis ci-dessus,

(d) une protéine ou un peptide tel que défini ci-dessus,

(e) un anticorps ou fragment d'anticorps tels que définis ci-dessus, et

(f) une puce à protéine telle que définie ci-dessus.

10 Ces différents réactifs sont préparés et utilisés selon les techniques classiques de biologie moléculaire et d'immunologie, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and Son Inc., Library of Congress, USA), dans *Current Protocols in Immunology* (John E. Cologan, 2000, Wiley and Son Inc.  
15 Library of Congress, USA) et dans *Antibodies : A Laboratory Manual* (E. Howell and D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

Les fragments d'acide nucléique selon l'invention sont préparés et utilisés selon les techniques classiques telles que définies ci-dessus. Les peptides et les protéines selon l'invention sont préparés par les techniques d'ADN recombinant,  
20 connues de l'Homme du métier, notamment à l'aide des vecteurs recombinants tels que définis ci-dessus. Alternativement, les peptides selon l'invention peuvent être préparés par les techniques classiques de synthèse en phase solide ou liquide, connues de l'Homme du métier.

Les anticorps polyclonaux sont préparés par immunisation d'un  
25 animal approprié avec une protéine ou un peptide tels que définis ci-dessus, éventuellement couplé à la KLH ou à l'albumine et/ou associé à un adjuvant approprié tel que l'adjuvant de Freund (complet ou incomplet) ou l'hydroxyde d'alumine ; après obtention d'un titre en anticorps satisfaisant, les anticorps sont récoltés par prélèvement du sérum des animaux immunisés et enrichis en IgG par précipitation, selon les  
30 techniques classiques, puis les IgG spécifiques des protéines du SARS-CoV sont éventuellement purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne appropriée

sur laquelle sont fixés ledit peptide ou ladite protéine, tels que définis ci-dessus, de façon à obtenir une préparation d'IgG monospécifiques.

Les anticorps monoclonaux sont produits à partir d'hybridomes obtenus par fusion de lymphocytes B d'un animal immunisé par une protéine ou un peptide tels que définis ci-dessus avec des myélomes, selon la technique de Köhler et Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497) ; les hybridomes sont cultivés *in vitro*, notamment dans des fermenteurs ou produits *in vivo*, sous forme d'ascite ; alternativement lesdits anticorps monoclonaux sont produits par génie génétique comme décrit dans le brevet américain US 4,816,567.

Les anticorps humanisés sont produits par des méthodes générales comme celles décrites dans la Demande Internationale WO 98/45332.

Les fragments d'anticorps sont produits à partir des régions V<sub>H</sub> et V<sub>L</sub> clonées, à partir des ARNm d'hybridomes ou de lymphocytes spléniques d'une souris immunisée ; par exemple, les fragments Fv, scFv ou Fab sont exprimés à la surface de phages filamenteux selon la technique de Winter et Milstein (Nature, 1991, 349, 293-299) ; après plusieurs étapes de sélection, les fragments d'anticorps spécifiques de l'antigène sont isolés et exprimés dans un système d'expression approprié, par les techniques classiques de clonage et d'expression d'ADN recombinant.

Les anticorps ou leur fragments tels que définis ci-dessus, sont purifiés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, telles que la chromatographie d'affinité.

La présente invention a en outre pour objet l'utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par : une paire d'amorces, une sonde, une puce à ADN, un vecteur recombinant, une cellule modifiée, une souche isolée de coronavirus, un polynucléotide, une protéine ou un peptide, un anticorps ou un fragment d'anticorps et une puce à protéine tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un réactif de détection et éventuellement de génotypage/sérotypage, d'un coronavirus associé au SRAS.

Les protéines et les peptides selon l'invention, qui sont aptes à être reconnus et/ou à induire la production d'anticorps spécifiques du coronavirus associé au SRAS, sont utiles pour le diagnostic de l'infection par un tel coronavirus ; l'infection est détectée, par une technique appropriée- notamment EIA, ELISA, RIA,

immunofluorescence-, à partir d'un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté.

Selon une disposition avantageuse de ladite utilisation, lesdites protéines sont sélectionnées dans le groupe constitué par les protéines S, E, M et/ou N et les peptides tels que définis ci-dessus.

Les protéines S, E, M et/ou N et les peptides dérivés de ces protéines tels que définis ci-dessus, par exemple la protéine N, sont utilisées pour le diagnostic indirect d'une infection à coronavirus associé au SRAS (diagnostic sérologique ; détection d'anticorps spécifiques du SARS-CoV), notamment par une méthode immunoenzymatique (ELISA).

Les anticorps et les fragments d'anticorps selon l'invention, notamment ceux dirigés contre les protéines S, E, M et/ou N et les peptides dérivés tels que définis ci-dessus, sont utiles pour le diagnostic direct d'une infection à coronavirus associé au SRAS ; la détection de protéine(s) du SARS-CoV est réalisée par une technique appropriée, notamment EIA, ELISA, RIA, immunofluorescence à partir d'un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté.

La présente invention a également pour objet une méthode de détection d'un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, laquelle méthode est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

(a) la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps, une protéine, un peptide ou bien une puce ou un filtre à protéine ou à peptide tels que définis ci-dessus, et

(b) la révélation par tout moyen approprié des complexes antigène-anticorps formés en (a), par exemple par EIA, ELISA, RIA, ou par immunofluorescence.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé l'étape (a) comprend :

(a<sub>1</sub>) la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un premier anticorps ou un fragment d'anticorps qui est fixé sur un support approprié, notamment une microplaque,

(a<sub>2</sub>) le lavage de la phase solide, et

(a<sub>3</sub>) l'addition d'au moins un second anticorps ou un fragment d'anticorps, différent du premier, ledit anticorps ou fragment d'anticorps étant éventuellement marqué de façon appropriée.

5 Ce procédé qui permet de capturer les particules virales présentes dans l'échantillon biologique est également dénommé procédé d'immunocapture.

Par exemple :

- l'étape (a<sub>1</sub>) est réalisée avec au moins un premier anticorps monoclonal ou polyclonal ou un fragment de ceux-ci, dirigé contre la protéine S, M, et/ou E, et/ou un peptide correspondant à l'ectodomaine de l'une de ces protéines (peptides  
10 M2-14 ou E1-12)

- l'étape (a<sub>3</sub>) est réalisée avec au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps dirigé contre un autre épitope de la même protéine ou de préférence contre une autre protéine, de manière préférée contre une protéine interne telle que la nucléoprotéine N ou l'endodomaine de la protéine E ou M, de manière encore plus préférée  
15 il s'agit d'anticorps ou de fragments d'anticorps dirigés contre la protéine N qui est très abondante dans la particule virale ; lorsqu'un anticorps ou un fragment d'anticorps dirigé contre une protéine interne (N) ou contre l'endodomaine des protéines E ou M est utilisé, le dit anticorps est incubé en présence de détergent, comme le Tween 20 par exemple, à des concentrations de l'ordre de 0,1 %.

20 - l'étape (b) de révélation des complexes antigène-anticorps formés est réalisée, soit directement à l'aide d'un second anticorps marqué par exemple avec de la biotine ou une enzyme appropriée telle que la peroxydase ou la phosphatase alcaline, soit indirectement à l'aide d'un sérum anti-immunoglobulines marqué comme ci-dessus. Les complexes ainsi formés sont révélés à l'aide d'un substrat  
25 approprié.

Selon une mise en œuvre préférée de cet aspect de l'invention, l'échantillon biologique est mélangé à l'anticorps monoclonal de révélation préalablement à sa mise en contact avec les anticorps monoclonaux de capture. Le cas échéant, le mélange sérum-anticorps de révélation est incubé pendant au moins 10 minutes à  
30 température ambiante avant d'être appliqué sur la plaque.

La présente invention a également pour objet un test d'immunocapture destiné à détecter une infection par le coronavirus associé au SRAS par

détection de la nucléoprotéine native (protéine N), en particulier caractérisé en ce que l'anticorps utilisé pour la capture de la nucléoprotéine virale native est un anticorps monoclonal spécifique de la région centrale et/ou d'un épitope conformationnel.

Selon un mode de réalisation dudit test, l'anticorps utilisé pour la  
5 capture de la protéine N est l'anticorps monoclonal Acm87, produit par l'hybridome déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004 sous le numéro I-3328.

Selon un autre mode de réalisation dudit test d'immunocapture, l'anticorps utilisé pour la capture de la protéine N est l'anticorps monoclonal Acm86, produit par l'hybridome déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004 sous le numéro I-  
10 3329.

Selon un autre mode de réalisation dudit test d'immunocapture, les anticorps monoclonaux Acm86 et Acm87 sont utilisés pour la capture de la protéine N.

Dans les tests d'immunocapture selon l'invention, on peut utiliser  
15 pour la révélation de la protéine N, l'anticorps monoclonal Acm57, produit par l'hybridome déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004 sous le numéro I-3330, ledit anticorps étant conjugué à une molécule ou une particule révélatrice.

Conformément audit test d'immunocapture, une combinaison des anticorps Acm57 et Acm87, conjugués à une molécule ou une particule révélatrice, est  
20 utilisée pour la révélation de la protéine N.

Une molécule révélatrice peut être un atome radioactif, un colorant, une molécule fluorescente, un fluorophore, une enzyme ; une particule révélatrice peut être, par exemple : de l'or colloïdal, une particule magnétique ou une bille de latex.

La présente invention a également pour objet un réactif de détection  
25 d'un coronavirus associé au SRAS, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

- (a) une paire d'amorces ou une sonde telles que définies ci-dessus,
- (b) un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus ou une cellule modifiée telle que définie ci-dessus,
- 30 (c) une souche isolée de coronavirus telle que définie ci-dessus ou un polynucléotide tel que défini ci-dessus,
- (d) un anticorps ou un fragment d'anticorps tel que défini ci-dessus,

(e) une combinaison d'anticorps comprenant les anticorps monoclonaux Acm86 et/ou Acm87, et l'anticorps monoclonal Acm57, telle que définie ci-dessus,

(f) une puce ou un filtre tels que définis ci-dessus.

5 La présente invention a également pour objet une méthode de détection d'une infection par un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, par ELISA IgG indirect utilisant la protéine N, laquelle méthode est caractérisée en ce que les plaques sont sensibilisées par une solution de protéine N à une concentration comprise entre 0,5 et 4µg/mL, de préférence 2µg/mL, dans un  
10 tampon PBS 10mM pH 7,2, rouge de phénol à 0,25mL /L.

La présente invention a, en outre, pour objet une méthode de détection d'une infection par un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, par ELISA double épitope, caractérisée en ce que le sérum à tester est mélangé à l'antigène de révélation, ledit mélange étant ensuite mis au contact de l'anti-  
15 gène fixé sur un support solide.

Selon une variante des tests de détection des coronavirus associé au SRAS, ces tests combinent un ELISA utilisant la protéine N, et un autre ELISA utilisant la protéine S, tel que décrit plus bas.

La présente invention a aussi pour objet un complexe immunitaire formé  
20 d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps polyclonal ou monoclonal tel que défini ci-dessus, et d'une protéine ou d'un peptide du coronavirus associé au SRAS.

La présente invention a en outre pour objet un kit de détection d'un coronavirus associé au SRAS, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif sélectionné dans le groupe constitué par : une paire d'amorces, une sonde, une puce à  
25 ADN ou à ARN, un vecteur recombinant, une cellule modifiée, une souche isolée de coronavirus, un polynucléotide, une protéine ou un peptide, un anticorps, et une puce à protéine tels que définis ci-dessus.

La présente invention a en outre pour objet, une composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un produit sélectionné  
30 dans le groupe constitué par :

a) une protéine ou un peptide tels que définis ci-dessus,

b) un polynucléotide de type ADN ou ARN ou l'un de ses fragments représentatifs tels que définis ci-dessus, de séquence choisie parmi :

(i) la séquence SEQ ID NO : 1 ou son équivalent ARN

(ii) la séquence hybridant dans des conditions de forte stringence  
5 avec la séquence SEQ ID NO : 1,

(iii) la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO : 1 ou de la séquence hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence SEQ ID NO : 1,

(iv) la séquence nucléotidique d'un fragment représentatif du polynucléotide tel que défini en (i), (ii) ou (iii),  
10

(v) la séquence telle que définie en (i), (ii), (iii) ou (iv), modifiée, et

c) un vecteur d'expression recombinant comprenant un polynucléotide tel que défini en b), et

d) une banque d'ADNc telle que définie ci-dessus,

15 ladite composition immunogène étant capable d'induire une immunité humorale ou cellulaire protectrice spécifique du coronavirus associé au SRAS, notamment la production d'un anticorps dirigé contre un épitope spécifique du coronavirus associé au SRAS.

Les protéines et les peptides tels que définis ci-dessus, notamment  
20 les protéines S, M, E et/ou N et les peptides dérivés, ainsi que les molécules d'acide nucléique (ADN ou ARN) codant lesdites protéines ou lesdits peptides, sont de bons candidats vaccin et peuvent être utilisées dans des compositions immunogènes pour la production d'un vaccin contre le coronavirus associé au SRAS.

Selon un mode de réalisation avantageux des compositions selon  
25 l'invention, elles contiennent en outre, au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement des substances porteuses et/ou des adjuvants.

Les véhicules pharmaceutiquement acceptables, les substances porteuses et les adjuvants sont ceux classiquement utilisés.

Les adjuvants sont avantageusement choisis dans le groupe constitué  
30 par des émulsions huileuses, de la saponine, des substances minérales, des extraits bactériens, de l'hydroxyde d'alumine et le squalène.

Les substances porteuses sont avantageusement sélectionnées dans le groupe constitué par des liposomes unilamellaires, des liposomes multilamellaires, des micelles de saponine ou des microsphères solides de nature saccharidique ou aurifère.

5 Les compositions selon l'invention, sont administrées par voie générale, notamment intramusculaire ou sous-cutanée ou bien par voie locale notamment nasale (aérosol).

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine ou d'un peptide isolé ou purifié présentant une séquence sélectionnée dans le  
10 groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 3, 10, 12, 14, 17, 22, 24, 26, 28, 30, 33, 35, 37, 69, 70, 71, 74 et 75 pour former un complexe immun avec un anticorps dirigé spécifiquement contre un épitope du coronavirus associé au SRAS.

La présente invention a également pour objet un complexe immun formé d'une protéine ou d'un peptide isolé ou purifié présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 3, 10, 12, 14, 17, 22,  
15 24, 26, 28, 30, 33, 35, 37, 69, 70, 71, 74 et 75, et d'un anticorps dirigé spécifiquement contre un épitope du coronavirus associé au SRAS.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine ou d'un peptide isolé ou purifié présentant une séquence sélectionnée dans le  
20 groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 3, 10, 12, 14, 17, 22, 24, 26, 28, 30, 33, 35, 37, 69, 70, 71, 74 et 75 pour induire la production d'un anticorps capable de reconnaître spécifiquement un épitope du coronavirus associé au SRAS.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polynuécléotide isolé ou purifié présentant une séquence sélectionnée dans le groupe  
25 constitué par les séquences SEQ ID NO : 1, 2, 4, 7, 8, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 31, 36 et 38 pour induire la production d'un anticorps dirigé contre la protéine codée par ledit polynuécléotide et capable de reconnaître spécifiquement un épitope du coronavirus associé au SRAS

La présente invention a également pour objet des anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine S native d'un coronavirus associé au SRAS.  
30

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine ou d'un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus,



ou d'un anticorps reconnaissant la protéine S native, tel que défini ci-dessus, pour détecter une infection par un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique.

La présente invention a également pour objet une méthode de détection d'une infection par un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, caractérisée en ce que la détection est effectuée par ELISA utilisant la protéine S recombinante, exprimée dans un système eucaryote.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode, il s'agit d'une méthode par ELISA double épitope, et le sérum à tester est mélangé à l'antigène de révélation, ledit mélange étant ensuite mis au contact de l'antigène fixé sur un support solide.

La présente invention a aussi pour objet un complexe immunitaire formé d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps monoclonal reconnaissant la protéine S native, et d'une protéine ou d'un peptide du coronavirus associé au SRAS.

La présente invention a également pour objet un complexe immunitaire formé d'une protéine ou d'un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, et d'un anticorps dirigé spécifiquement contre un épitope du coronavirus associé au SRAS.

La présente invention a en outre pour objet un kit ou coffret de détection d'un coronavirus associé au SRAS, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif sélectionné dans le groupe constitué par : une protéine ou polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, un acide nucléique codant pour une protéine ou polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, une cellule exprimant une protéine ou polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, ou un anticorps reconnaissant la protéine S native d'un coronavirus associé au SRAS.

La présente invention a pour objet une composition immunogène et/ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide ou une protéine recombinante de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus, obtenu dans un système d'expression eucaryote.

La présente invention a également pour objet une composition immunogène et/ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur ou virus

recombinant, exprimant une protéine ou un polypeptide de la famille de la protéine S, telle que définie ci-dessus.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du polynucléotide représentant le génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589, et des fragments d'ADNc dérivés objets de la présente invention, ainsi qu'au Tableau I présentant la liste des séquences :

**Tableau I : Liste des séquences**

numéro d'identification	Séquence	Position de l'ADNc en référence à Genbank AY274119.3	Numéro de dépôt à la CNCM du plasmide correspondant
SEQ ID NO : 1	génome de la souche issue du prélèvement 031589	-	-
SEQ ID NO : 2	ORF-S*	21406-25348	-
SEQ ID NO : 3	Protéine S	-	-
SEQ ID NO : 4	ORF-S**	21406-25348	I-3059
SEQ ID NO : 5	fragment Sa	21406-23454	I-3020
SEQ ID NO : 6	fragment Sb	23322-25348	I-3019
SEQ ID NO : 7	ORF-3+ORF-4*	25110-26244	-
SEQ ID NO : 8	ORF-3+ORF-4**	25110-26244	I-3126
SEQ ID NO : 9	ORF3	-	-
SEQ ID NO : 10	Protéine ORF-3	-	-
SEQ ID NO : 11	ORF4	-	-
SEQ ID NO : 12	Protéine ORF-4	-	-
SEQ ID NO : 13	ORF-E*	26082-26413	-
SEQ ID NO : 14	Protéine E	-	-
SEQ ID NO : 15	ORF-E**	26082-26413	I-3046
SEQ ID NO : 16	ORF-M*	26330-27098	-
SEQ ID NO : 17	Protéine M	-	-
SEQ ID NO : 18	ORF-M**	26330-27098	I-3047
SEQ ID NO : 19	ORF7 à 11*	26977-28218	-
SEQ ID NO : 20	ORF7 à 11**	26977-28218	I-3125
SEQ ID NO : 21	ORF7	-	-
SEQ ID NO : 22	Protéine ORF7	-	-
SEQ ID NO : 23	ORF8	-	-
SEQ ID NO : 24	Protéine ORF8	-	-
SEQ ID NO : 25	ORF9	-	-

SEQ ID NO : 26	Protéine ORF9	-	-
SEQ ID NO : 27	ORF10	-	-
SEQ ID NO : 28	Protéine ORF10	-	-
SEQ ID NO : 29	ORF11	-	-
SEQ ID NO : 30	Protéine ORF11	-	-
SEQ ID NO : 31	OrF1ab	265-21485	-
SEQ ID NO : 32	ORF13	28130-28426	-
SEQ ID NO : 33	Protéine ORF13	-	-
SEQ ID NO : 34	ORF14	-	-
SEQ ID NO : 35	Protéine ORF14	28583-28795	-
SEQ ID NO : 36	ORF-N*	28054-29430	-
SEQ ID NO : 37	Protéine N	-	-
SEQ ID NO : 38	ORF-N**	28054-29430	I-3048
SEQ ID NO : 39	5'non-codante**	1-204	I-3124
SEQ ID NO : 40	3'non-codante**	28933-29727	I-3123
	<b>ORF1ab</b>		-
SEQ ID NO : 41	Fragment L0	30-500	-
SEQ ID NO : 42	Fragment L1	211-2260	-
SEQ ID NO : 43	Fragment L2	2136-4187	-
SEQ ID NO : 44	Fragment L3	3892-5344	-
SEQ ID NO : 45	Fragment L4b	4932-6043	-
SEQ ID NO : 46	Fragment L4	5305-7318	-
SEQ ID NO : 47	Fragment L5	7275-9176	-
SEQ ID NO : 48	Fragment L6	9032-11086	-
SEQ ID NO : 49	Fragment L7	10298-12982	-
SEQ ID NO : 50	Fragment L8	12815-14854	-
SEQ ID NO : 51	Fragment L9	14745-16646	-
SEQ ID NO : 52	Fragment L10	16514-18590	-
SEQ ID NO : 53	Fragment L11	18500-20602	-
SEQ ID NO : 54	Fragment L12	20319-22224	-
SEQ ID NO : 55	Amorce N sens	-	-
SEQ ID NO : 56	Amorce N antisens	-	-
SEQ ID NO : 57	Amorce S <sub>C</sub> sens	-	-
SEQ ID NO : 58	Amorce S <sub>L</sub> sens	-	-
SEQ ID NO : 59	Amorce S <sub>C</sub> e t S <sub>L</sub> antisens	-	-
SEQ ID NO : 60	Amorce sens série 1	28507-28522	-
SEQ ID NO : 61	Amorce antisens série 1	28774-28759	-
SEQ ID NO : 62	Amorce sens série 2	28375-28390	-
SEQ ID NO : 63	Amorce antisens série 2	28702-28687	-
SEQ ID NO : 64	Sonde 1/série 1	28561-28586	-

SEQ ID NO : 65	Sonde 2/série 1	28588-28608	-
SEQ ID NO : 66	Sonde 1/série 2	28541-28563	-
SEQ ID NO : 67	Sonde 2/série 2	28565-28589	-
SEQ ID NO : 68	Amorce ancre 14T		
SEQ ID NO : 69	Peptide M2-14	-	-
SEQ ID NO : 70	Peptide E1-12	-	-
SEQ ID NO : 71	Peptide E53-76	-	-
SEQ ID NO : 72	5'non-codante*	1-204	-
SEQ ID NO : 73	3'non-codante*	28933-29727	-
SEQ ID NO : 74	Protéine ORF1a	-	-
SEQ ID NO : 75	Protéine ORF1b	-	-
SEQ ID NO:76-139	Amorces		
SEQ ID NO:140	Pseudogène de S		
SEQ ID NO:141-148	amorces		
SEQ ID NO:149	Aa1-13 de S		
SEQ ID NO:150	polypeptide		
SEQ ID NO:151-158	amorces		

\* produit d'amplification PCR (amplicon)

\*\* insert cloné dans le plasmide déposé à la CNCM

ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'analyse par Western-blot de l'expression *in vitro* des protéines recombinantes N, S<sub>C</sub> et S<sub>L</sub> à partir des vecteurs d'expression pIVEX. Piste 1 : pIV2.3N. Piste 2 : pIV2.3S<sub>C</sub>. Piste 3 : pIV2.3S<sub>L</sub>. Piste 4 : pIV2.4N. Piste 5 : pIV2.4S<sub>I</sub> ou pIV2.4S<sub>C</sub>. Piste 6 : pIV2.4S<sub>L</sub>. L'expression de la protéine GFP exprimée à partir du même vecteur est utilisée comme contrôle.
- la figure 2 illustre l'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et coloration au bleu de Coomassie, de l'expression *in vivo* de la protéine N à partir des vecteurs d'expression pIVEX. La souche d'*E.coli* BL21(DE3)pDIA17 transformée par les vecteurs pIVEX recombinants est cultivée à 30°C dans du milieu LB, en présence ou en l'absence d'inducteur (IPTG 1mM). Piste 1 : pIV2.3N Piste 2 : pIV2.4N.
- la figure 3 illustre l'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et coloration au bleu de Coomassie, de l'expression *in vivo* des polypeptides S<sub>L</sub> et S<sub>C</sub> à partir des vecteurs

d'expression pIVEX. La souche d'*E.coli* BL21(DE3)pDIA17 transformée par les vecteurs pIVEX recombinants est cultivée à 30°C dans du milieu LB, en présence ou en l'absence d'inducteur (IPTG 1mM). Piste 1 : pIV2.3S<sub>C</sub> Piste 2 : pIV2.3S<sub>L</sub>. Piste 3 : pIV2.4S<sub>I</sub> Piste 4 : pIV2.4S<sub>L</sub>.

- 5 - la figure 4 illustre l'activité antigénique des protéines N, S<sub>L</sub> et S<sub>C</sub> recombinantes produites dans la souche *E. coli* BL21(DE3)pDIA17 transformée par les vecteurs pIVEX recombinants. A : électrophorèse (SDS-PAGE) des lysats bactériens. B et C : Western-blot avec les sérums, provenant d'un même patient infecté par le SARS-CoV, prélevés respectivement 8 jours (B : sérum M12) et 29 jours (C : sérum M13) après le début des symptômes du SRAS. Piste 1 : pIV2.3N. Piste 2 : pIV2.4N. Piste 3 : pIV2.3S<sub>C</sub>. Piste 4 : pIV2.4 S<sub>I</sub>. Piste 5 : pIV2.3S<sub>L</sub>. Piste 6 : pIV2.4S<sub>L</sub>

- 10 - la figure 5 illustre la purification sur colonne Ni-NTA agarose de la protéine N recombinante produite dans la souche *E. coli* BL21(DE3)pDIA17 à partir du vecteur pIV2.3N. Piste 1 : Extrait bactérien total. Piste 2 : Extrait soluble. Piste 3 : Extrait insoluble. Piste 4 : Extrait déposé sur la colonne Ni-NTA. Piste 5 : protéines non-retenues. Piste 6 : Fractions du pic 1. Piste 7 : Fractions du pic 2.

- 15 - la figure 6 illustre la purification de la protéine S<sub>C</sub> recombinante à partir des corps d'inclusions produits dans la souche *E. coli* BL21(DE3)pDIA17 transformée par le pIV2.4S<sub>I</sub>.A. Traitement au Triton X-100 (2%) : Piste 1 : Extrait bactérien total. Piste 2 : Extrait soluble. Piste 3 : Extrait insoluble. Piste 4 : Surnageant après traitement au Triton X-100 (2 %). Pistes 5 et 6 : Culot après traitement au Triton X-100 (2 %).B : Traitement à l'urée 4M, 5M, 6M et 7M des extraits solubles et insolubles.

- 25 - la figure 7 représente l'immunoempreinte réalisée à l'aide d'un lysat de cellules infectées par le SARS-CoV et d'un sérum de patient atteint de pneumopathie atypique.

- 30 - la figure 8 représente des immunoempreintes réalisées à l'aide d'un lysat de cellules infectées par le SARS-CoV et d'immunsérums de lapins spécifiques de la nucléoprotéine N (A) et de la protéine de spicule S (B). I.S. : sérum immun. p.i. : sérum pré-immun. L'immunsérum anti-N a été utilisé au 1/50000 et l'immunsérum anti-S au 1/10000.

- la figure 9 illustre la réactivité en ELISA des sérums polyclonaux monospécifiques de lapin dirigés contre la protéine N ou le fragment court de la protéine S ( $S_C$ ), vis-à-vis des protéines recombinantes correspondantes utilisées pour l'immunisation. A : lapins P13097, P13081, et P13031 immunisés avec la protéine N recombinante purifié. B : lapins P11135, P13042, et P14001 immunisés avec une  
5 préparation de corps d'inclusions correspondants au fragment court de la protéine S ( $S_C$ ). I.S. : sérum immun. p.i. : sérum pré-immun.

- la figure 10 illustre la réactivité en ELISA de la protéine N recombinante purifiée, vis-à-vis de sérum de patients atteints de pneumonie atypique  
10 causée par le SARS-CoV. Figure 10a : plaques ELISA préparés avec la protéine N à la concentration de 4  $\mu\text{g/ml}$  et 2  $\mu\text{g/ml}$ . Figure 10b : plaque ELISA préparée avec la protéine N à la concentration de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Les sérums désignés A, B, D, E, F, G, H correspondent à ceux du Tableau IV.

- la figure 11 illustre l'amplification par RT-PCR de quantités  
15 décroissantes d'ARN synthétique du gène N du SARS-CoV ( $10^7$  à 1 copie), à l'aide des couples d'amorces n° 1 (N+/28507, N-/28774) (A) et n° 2 (N+/28375, N-/28702) (B). T : amplification réalisée en l'absence d'ARN. MW : marqueur d'ADN.

- la figure 12 illustre l'amplification par RT-PCR en temps réel d'ARN synthétique du gène N du SARS-CoV : des quantités décroissantes d'ARN  
20 synthétique en répliquat (repli. ; pistes 16 à 29) ainsi que de l'ARN viral dilué au  $1/20 \times 10^{-4}$  (piste 32) ont été amplifiés par RT-PCR en temps réel à l'aide du kit "Light Cycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes" et des couples d'amorces et de sondes de la série n° 2, dans les conditions décrites à l'exemple 8.

- la figure 13 (figure 13.1 à 13.70) représente la carte de restriction  
25 de la séquence SEQ ID NO : 1 correspondant à l'équivalent ADN du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589.

- la figure 14 montre le résultat du test de sérologie SRAS par ELISA N indirect (1ère série de sérums testés)

- la figure 15 montre le résultat du test de sérologie SRAS par  
30 ELISA N indirect (2ème série de sérums testés)

- la figure 16 présente le résultat du test de sérologie SRAS par ELISA N double épitope (1ère série de sérums testés)

- la figure 17 montre le résultat du test de sérologie SRAS par ELISA N double épitope (2ème série de sérums testés)

5                   - la figure 18 illustre le test de réactivité des anticorps monoclonaux anti-N par ELISA sur la nucléoprotéine N native du SRAS-CoV. Les anticorps ont été testés sous la forme de surnageants de culture d'hybridomes par un ELISA indirect utilisant un lysat irradié de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène (courbes lysat SRAS). Un contrôle négatif de réactivité est réalisé pour  
10 chaque anticorps sur un lysat de cellules VeroE6 non infectées (courbes lysat négatif). Plusieurs anticorps monoclonaux de spécificité connue ont été utilisés comme anticorps témoins négatifs : para1-3 dirigé contre les antigènes des virus parainfluenza de type 1-3 (Bio-Rad) et grippe B dirigé contre les antigènes du virus de la grippe de type B (Bio-Rad).

15                   - la figure 19 illustre le test de réactivité des anticorps monoclonaux anti-N du SRAS-CoV par ELISA sur les antigènes natifs du coronavirus humain 229E (HCoV-229E). Les anticorps ont été testés sous la forme de surnageants de culture d'hybridomes par un test ELISA indirect utilisant un lysat de cellules MRC-5 infectées par le coronavirus humain 229E comme antigène (courbes lysat 229E). Un  
20 contrôle négatif d'immunoréactivité est réalisé pour chaque anticorps sur un lysat de cellules MRC-5 non infectées (courbes lysat négatif). L'anticorps monoclonal 5-11H.6 dirigé contre la protéine S du coronavirus humain 229E (Sizun et al. 1998, J. Virol. Met. 72 : 145-152) est utilisé comme anticorps témoin positif. Les anticorps para1-3 dirigé contre les antigènes des virus parainfluenza de type 1-3 (Bio-Rad) et grippe B  
25 dirigé contre les antigènes du virus de la grippe de type B (Bio-Rad) ont été ajoutés au panel des anticorps monoclonaux testés.

                  - la figure 20 montre un test de réactivité des anticorps monoclonaux anti-N du SRAS-CoV par western blot sur la nucléoprotéine N native du SRAS-CoV dénaturée. Un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV a été préparé dans  
30 le tampon de dépôt selon Laemmli et mis à migrer dans un gel SDS à 12% de polyacrylamide puis les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF. Les anticorps monoclonaux anti-N testés ont été utilisés pour l'immunoessai à la concen-

tration de 0.05 µg/ml. La révélation est faite avec des anticorps anti-IgG(H+L) de souris couplés à la peroxydase (NA93IV, Amersham) et le système ECL+. Deux anticorps monoclonaux ont été utilisés comme témoins négatifs de réactivité : grippe B dirigé contre les antigènes du virus de la grippe de type B (Bio-Rad) et para1-3 dirigé  
 5 contre les antigènes des virus parainfluenza de type 1-3 (Bio-Rad).

- la figure 21 présente les plasmides d'expression en cellules de mammifères de la protéine S du SRAS-CoV. Le cDNA de la S du SRAS-CoV a été inséré entre les sites BamH1 et Xho1 du plasmide d'expression pcDNA3.1(+) (Clontech) pour obtenir le plasmide pcDNA-S et entre les sites Nhe1 et Xho1 du  
 10 plasmide d'expression pCI (Promega) pour obtenir le plasmide pCI-S. Les séquences WPRE et CTE ont été insérées dans chacun des deux plasmides pcDNA-S et pCI-S entre les sites Xho1 et Xba1 pour obtenir respectivement les plasmides pcDNA-S-CTE, pcDNA-S-WPRE, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE.

SP : peptide signal prédit (aa 1-13) avec le logiciel signalP v2.0  
 15 (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering, 10 : 1-6)

TM : région transmembranaire prédite (aa 1196-1218) avec le logiciel TMHMM v2.0 (Sonnhammer et al., 1998, Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175-182, AAAI Press). Il faut noter que les acides aminés W1194 et P1195 font possiblement partie de la région trans-  
 20 membranaire avec des probabilités respectives de 0,13 et 0,42

P-CMV : promoteur immédiat/précoce du cytomégalo virus. BGH

pA : signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance bovine

SV40 late pA : signal de polyadénylation tardif du virus SV40

SD/SA : sites donneur et accepteur d'épissage

25 WPRE : séquences du "Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element" du virus de l'hépatite de la marmotte

CTE : séquences du "constitutive transport element" du rétrovirus simien de Mason-Pfizer

- la figure 22 illustre l'expression de la protéine S après transfection  
 30 de cellules VeroE6. Des extraits cellulaires ont été préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 par les plasmides pcDNA, pcDNA-S, pCI et pCI-S. Des extraits cellulaires ont également été préparés 18 heures après infection par le virus



recombinant de la vaccine VV-TF7.3 et transfection par les plasmides pcDNA ou pcDNA-S. A titre de contrôle, des extraits de cellules VeroE6 ont été préparés 8 heures après infection par le SRAS-CoV à une multiplicité d'infection de 3. Ils ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham). Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

SRAS-CoV : extrait de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV

Mock : extrait contrôle de cellules non infectées

- 10 - la figure 23 illustre l'effet des séquences CTE et WPRE sur l'expression de la protéine S après transfection de cellules VeroE6 et 293T. Des extraits cellulaires ont été préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 (A) ou 293T (B) par les plasmides pcDNA, pcDNA-S, pcDNA-S-CTE, pcDNA-S-WPRE, pCI-S, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE, séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham). Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

SRAS-CoV : extrait de cellules VeroE6 préparés 8 heures après infection par le SRAS-CoV à une multiplicité d'infection de 3.

- 20 Mock : extrait contrôle de cellules VeroE6 non infectées

- la figure 24 présente des vecteurs lentiviraux défectifs à DNA flap central pour l'expression de la S du SRAS-CoV. Le cADN de la protéine S du SRAS-CoV a été cloné sous la forme d'un fragment BamHI-XhoI dans le plasmide pTRIP $\Delta$ U3-CMV contenant un vecteur lentiviral défectif TRIP à DNA flap central (Sirven et al, 2001, Mol. Ther., 3 :438-448) pour obtenir le plasmide pTRIP-S. Les cassettes d'expression optimales constituées du promoteur immédiat/précoce du virus CMV, d'un signal d'épissage, du cDNA de la S et de l'un ou l'autre des signaux post-transcriptionnels CTE ou WPRE ont été substituées à la cassette EF1 $\alpha$ -EGFP du vecteur d'expression lentiviral défectif à DNA FLAP central TRIP $\Delta$ U3-EF1 $\alpha$  (Sirven et al, 2001, Mol. Ther., 3 :438-448) pour obtenir les plasmides pTRIP-SD/SA-S-CTE et pTRIP-SD/SA-S-WPRE.

SP : peptide signal

TM : région transmembranaire

P-CMV : promoteur immédiat/précoce du cytomégalo virus

P-EF1 $\alpha$  : promoteur du gène EF1 $\alpha$

SD/SA : sites donneur et accepteur d'épissage

5 WPRE : séquences du "Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element" du virus de l'hépatite de la marmotte

CTE : séquences du "constitutive transport element" du rétrovirus simien de Mason-Pfizer

LTR : « Long terminal repeat »

10  $\Delta$ U3 : LTR délété des séquences « promoter/enhancer »

cPPT : « polypurine tract cis-active sequence »

CTS : « central termination sequence »

-la figure 25 montre l'analyse par western blot de l'expression de la S du SRAS-CoV par des lignées cellulaires transduites par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-S-WPRE et TRIP-SD/SA-S-CTE. Des extraits cellulaires ont été préparés à partir de lignées FrhK4-S-CTE et FrhK4-S-WPRE établies après transduction par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-S-CTE et TRIP-SD /SA-S-WPRE respectivement. Ils ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un conjugué anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase. Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

T- : extrait contrôle de cellules FrhK-4

T+ : extrait de cellules FrhK-4 préparées 24h après infection par le SRAS-CoV à une multiplicité d'infection de 3.

25 - la figure 26 concerne l'analyse de l'expression de polypeptide Ssol par des lignées cellulaires transduites par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-CTE. La sécrétion du polypeptide Ssol a été recherchée dans le surnageant d'une série de clones cellulaires isolés après transduction de cellules FRhK-4 par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-CTE. 5  $\mu$ l de surnageant dilués au 1/2 dans du tampon de dépôt selon Laemmli ont été analysés par western blot révélé par un anticorps monoclonal anti-FLAG (M2, Sigma) et un conjugué anti-IgG(H+L) de souris couplé à la peroxidase.

T<sup>-</sup> : surnageant de la lignée FRhK-4 parentale. T<sup>+</sup> : surnageant de cellules BHK infectées par un virus recombinant de la vaccine exprimant le polypeptide Ssol. La flèche pleine indique le polypeptide Ssol, tandis que la flèche creuse indique une réaction croisée avec une protéine d'origine cellulaire.

5                   - la figure 27 montre les résultats relatifs à l'analyse du polypeptide Ssol purifié

A. 8, 2, 0.5 et 0.125 µg de polypeptide recombinant Ssol purifié par chromatographie d'affinité anti-FLAG et gel filtration (G75) ont été séparés sur gel SDS à 8% de polyacrylamide. Le polypeptide Ssol ainsi que des quantités variables de  
10   marqueurs de masse moléculaire (MM) ont été révélés par coloration au nitrate d'argent (Gelcode SilverSNAP stain kit II, Pierce).

B. Marqueurs étalons pour l'analyse par spectrométrie de masse SELDI-TOF

IgG : IgG bovine de MM 147300

15           ConA : conalbumine de MM 77490

HRP : peroxydase de raifort analysée à titre de contrôle et de MM  
43240

C. Analyse par spectrométrie de masse (SELDI-TOF) du polypeptide recombinant Ssol.

20           Les pics A et B correspondent au polypeptide Ssol simplement et doublement chargé.

D. Séquençage de l'extrémité N-terminale du polypeptide recombinant Ssol. 5 cycles de dégradation d'Edman en phase liquide ont été réalisés sur un séquenceur ABI494 (Applied Biosystems).

25           - la figure 28 illustre l'influence d'un signal d'épissage et des séquences CTE et WPRE sur l'efficacité de l'immunisation génique à l'aide d'ADN plasmidique codant la S du SRAS-CoV

A. Des groupes de 7 souris BALB/c ont été immunisés à deux reprises à 4 semaines d'intervalle à l'aide de 50 µg d'ADN plasmidique de pCI, pcDNA-S, pCI-S, pcDNA-N et pCI-HA.  
30

B. Des groupes de 6 souris BALB/c ont été immunisés à deux reprises à 4 semaines d'intervalle à l'aide de 2 µg, 10µg ou 50 µg d'ADN plasmidique de pCI, pCI-S, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE.

Les sérums immuns prélevés 3 semaines après la deuxième immunisation ont été analysés par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène. Les titres en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) et du TMB (KPL).

10 - la figure 29 montre la séroneutralisation de l'infectivité du SRAS-CoV par les anticorps induits chez la souris après immunisation génique à l'aide d'ADN plasmidique codant la S du SRAS-CoV. Des pools de sérums immuns prélevés 3 semaines après la deuxième immunisation ont été réalisés pour chacun des groupes des expériences décrites dans la figure 28 et évalués pour leur capacité à  
15 séroneutraliser l'infectivité de 100 TCID50 du SRAS-CoV sur cellules FRhK-4. 4 points sont réalisés pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infectivité de 2 cupules sur 4.

A. Groupes de souris BALB/c immunisés à deux reprises à 4  
20 semaines d'intervalle à l'aide de 50 µg d'ADN plasmidique de pCI, pcDNA-S, pCI-S, pcDNA-N et pCI-HA. □ : sérum préimmun. ■ : sérum immun.

B. Groupes de souris BALB/c immunisés à deux reprises à 4 semaines d'intervalle à l'aide de 2 µg, 10µg ou 50 µg d'ADN plasmidique de pCI, pCI-S, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE.

25 - la figure 30 illustre l'immunoréactivité du polypeptide recombinant Ssol vis à vis de sérums de patients atteints de SRAS. La réactivité de sérums de patients a été analysée par test ELISA indirect contre des phases solides préparées à l'aide du polypeptide recombinant Ssol purifié. Les anticorps de patients réagissant avec la phase solide à une dilution de 1/400 sont révélés par un anticorps polyclonal  
30 anti-IgG(H+L) humain couplé à la peroxidase (Amersham NA933V) et du TMB plus H2O2 (KPL). Les sérums de cas probables de SRAS sont identifiés par un numéro d'ordre du Centre National de Référence des Virus Influenzae ainsi que par les

initiales du patient et le nombre de jours écoulés depuis le début des symptômes, le cas échéant. Les sérums TV sont des sérums témoins de sujets qui ont été prélevés en France avant l'épidémie de SRAS survenue en 2003.

- La figure 31 montre l'induction d'anticorps dirigés contre le SRAS-CoV après immunisation avec le polypeptide recombinant Ssol. Deux groupes de 6 souris ont été immunisés à 3 semaines d'intervalle avec 10 µg de polypeptide recombinant Ssol (groupe Ssol) adjuvé avec de l'hydroxyde d'aluminium ou, à titre de contrôle, de l'adjuvant seul (groupe mock). Trois immunisations successives ont été réalisées et les sérums immuns ont été prélevés 3 semaines après chacune des trois immunisations (IS1, IS2, IS3). Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des 2 groupes par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène. Les titres en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxidase (Amersham) et du TMB (KPL).

- La figure 32 présente l'alignement nucléotidique des séquences du gène synthétique 040530 avec la séquence du gène sauvage de l'isolat 031589 du SRAS-CoV. I-3059 correspond aux nucléotides 21406-25348 de l'isolat 031589 du SRAS-CoV déposé à la C.N.C.M. sous le numéro I-3059 (SEQ ID NO : 4, plasmide pSRAS-S). S-040530 est la séquence du gène synthétique 040530.

- la figure 33 illustre l'utilisation d'un gène synthétique pour l'expression de la S du SRAS-CoV. Des extraits cellulaires préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 (A) ou 293T (B) par les plasmides pCI, pCI-S, pCI-S-CTE, pCI-S-WPRE et pCI-Ssynth ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham). Le western blot est révélé par luminescence (ECL+, Amersham) et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad). Les niveaux d'expression de la protéine S ont été mesurés en quantifiant les 2 bandes majoritaires repérées sur l'image.

- la figure 34 présente un schéma de la construction des virus vaccine recombinants VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN-S et VV-TN-Ssol

A. Les cDNA de la protéine S et du polypeptide Ssol du SRAS-CoV ont été inséré entre les sites BamH1 et Sma1 du plasmide de transfert pTG186 pour obtenir les plasmides pTG-S et pTG-Ssol.

5 B. Les séquences du promoteur synthétique 480 ont ensuite été substituées à celles du promoteur 7.5 par échange du fragment Nde1-Pst1 des plasmides pTG186poly, pTG-S et pTG-Ssol pour obtenir les plasmides de transfert pTN480, pTN-S et pTN-Ssol.

C. Séquence du promoteur synthétique 480 tel que contenu entre les sites Nde1 et Pst1 des plasmides de transfert de la série pTN. Un site Asc1 a été inséré  
10 pour faciliter les manipulations ultérieures. Les sites de restriction ainsi que la séquence du promoteur sont soulignés

D. Les virus recombinants de la vaccine sont obtenus par double recombinaison homologue *in vivo* entre la cassette TK des plasmides de transfert des séries pTG et pTN et le gène TK de la souche Copenhague du virus de la vaccine.

15 SP : peptide signal prédit (aa 1-13) avec le logiciel signalP v2.0 (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering, 10 : 1-6)

TM : région transmembranaire prédite (aa 1196-1218) avec le logiciel TMHMM v2.0 (Sonnhammer et al., 1998, Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175-182, AAAI Press). Il faut noter que  
20 les acides aminés W1194 et P1195 font possiblement partie de la région transmembranaire avec des probabilités respectives de 0,13 et 0,42.

TK-L, TK-R : parties gauche et droite du gène de la thymidine kinase du virus de la vaccine

MCS : site multiple de clonage

25 PE : promoteur précoce

PL : promoteur tardif

PL synth : promoteur tardif synthétique 480

- la figure 35 illustre l'expression de la protéine S par les virus vaccine recombinants, analysée par western blot. Des extraits cellulaires ont été préparés 18 heures après infection de cellules CV1 par les virus vaccine recombinants VV-TG, VV-TG-S et VV-TN-S à une M.O.I. de 2 (A). A titre de contrôle, des extraits de  
30 cellules VeroE6 ont été préparés 8 heures après infection par le SRAS-CoV à une

multiplicité d'infection de 2. Des extraits cellulaires ont également été préparés 18 heures après infection de cellules CV1 par les virus vaccine recombinants VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN, VV-TN-S et VV-TN-Ssol (B). Ils ont été séparés sur des gels SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham). « 1µl » et « 10µl » indique les quantités d'extraits cellulaires déposées sur le gel. Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

SRAS-CoV : extrait de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV  
Mock : extrait contrôle de cellules non infectées  
- la figure 36 montre le résultat d'une analyse par western blot de la sécrétion du polypeptide Ssol par les virus vaccine recombinants.

A. Des surnageants de cellules CV1 infectées par le virus vaccine recombinant VV-TN, différents clones du virus VV-TN-Ssol et par les virus VV-TG-Ssol ou VV-TN-Sflag ont été récoltés 18 heures après infection de cellules CV1 à une M.O.I. de 2.

B. Des surnageants de cellules 293T, FRhK-4, BHK-21 et CV1 infectées en dupliqués (1,2) par le virus vaccine recombinant VV-TN-Ssol à une M.O.I. de 2 ont été récoltés 18 heures après infection. Le surnageant de cellules CV1 infectées par le virus VV-TN a également été récolté à titre de contrôle (M).

Tous les surnageants ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide selon Laemmli et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-FLAG et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) (A) ou à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham) (B).

Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

- la figure 37 montre l'analyse du polypeptide Ssol, purifié par gel SDS de polyacrylamide

10, 5 et 2 µl de polypeptide recombinant Ssol purifié par chromatographie d'affinité anti-FLAG ont été séparés sur gel SDS en gradient de 4 à 15 % de polyacrylamide. Le polypeptide Ssol ainsi que des quantités variables de marqueurs de

masse moléculaire (MM) ont été révélés par coloration au nitrate d'argent (Gelcode SilverSNAP stain kit II, Pierce).

- la figure 38 illustre l'immunoréactivité du polypeptide recombinant Ssol produit par le virus vaccine recombinant VV-TN-Ssol vis-à-vis de sérums de patients atteints de SRAS. La réactivité de sérums de patients a été analysée par test ELISA indirect contre des phases solides préparées à l'aide du polypeptide recombinant Ssol purifié. Les anticorps de patients réagissant avec la phase solide à une dilution de 1/100 et 1/400 sont révélés par un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) humain couplé à la peroxidase (Amersham NA933V) et du TMB plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KPL). Les sérums de cas probables de SRAS sont identifiés par un numéro d'ordre du Centre National de Référence des Virus Influenzae ainsi que par les initiales du patient et le nombre de jours écoulés depuis le début des symptômes, le cas échéant. Les sérums TV sont des sérums témoins de sujets qui ont été prélevés en France avant l'épidémie de SRAS survenue en 2003.

- la figure 39 montre la réponse en anticorps anti-SRAS-CoV chez la souris après immunisation par les virus vaccine recombinants. Des groupes de 7 souris BALB/c ont été immunisés par voie i.v. à deux reprises à 4 semaines d'intervalle par 106 u.f.p. de virus vaccine recombinants VV-TG, VV-TG-HA, VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN, VV-TN-S, VV-TN-Ssol.

A. Des pools de sérums immuns prélevés 3 semaines après chacune des deux immunisations ont été réalisés pour chacun des groupes et ont été analysés par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène. Les titres en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) et du TMB (KPL).

B. Les pools de sérums immuns ont été évalués pour leur capacité à séroneutraliser l'infectivité de 100 TCID<sub>50</sub> du SRAS-CoV sur cellules FRhK-4. 4 points sont réalisés pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infectivité de 2 cupules sur 4.



- la figure 40 décrit la construction des virus recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol.

A. Le vecteur rougeole est un génome complet de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole (MV) dans lequel une unité de transcription  
5 supplémentaire a été introduite (Combredet, 2003, Journal of Virology, 77 : 11546-11554). L'expression des phases ouvertes de lecture (ORF) supplémentaires est contrôlée par les éléments agissant en cis nécessaires à la transcription, à la formation de la coiffe et à la polyadénylation du transgène, qui ont été copiés des éléments  
10 présents à la jonction N/P. 2 vecteurs différents permettent l'insertion entre les gènes P (phosphoprotéine) et M (matrice) d'une part et H (hémagglutinine) et L (polymérase) d'autre part.

B. Les génomes recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol du virus de la rougeole ont été construits par l'insertion des ORFs de la protéine S et du polypeptide Ssol au sein d'une unité de transcription supplémentaire  
15 localisée entre les gènes P et M du vecteur.

Les différents gènes du virus de la rougeole (MV) sont indiqués : N (nucléoprotéine), PVC (phosphoprotéine et protéine V/C), M (matrice), F (fusion), H (hémagglutinine), L (polymérase). T7 = promoteur de l'ARN polymérase T7, hh = ribozyme hammerhead, T7t = séquence terminatrice de l'ARN polymérase du phage  
20 T7,  $\partial$  = ribozyme du virus de l'hépatite  $\partial$ , (2), (3) = unités de transcription supplémentaires (ATU).

Taille du génome du MV : 15894 nt.

SP : peptide signal

TM : région transmembranaire

25 FLAG : étiquette FLAG

- la figure 41 illustre l'expression de la protéine S par les virus rougeole recombinants, analysée par western blot.

Des extraits cytoplasmiques ont été préparés après infection de cellules Vero par différents passages des virus MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol et le virus sauvage MWSchw à titre de contrôle. Des extraits cellulaires en  
30 tampon de dépôt selon Laemmli ont également été préparés 8 heures après infection de cellules VeroE6 par le SRAS-CoV à une multiplicité d'infection de 3. Ils ont été

séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham).

Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

5 Pn : nième passage du virus après coculture de cellules 293-3-46 et Vero.

SRAS-CoV : extrait de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV

Mock : extrait contrôle de cellules VeroE6 non infectées

10 - la figure 42 montre l'expression de la protéine S par les virus rougeole recombinants, analysée par immunofluorescence

Des cellules Vero en monocouches sur lamelles de verre ont été infectées par le virus sauvage MWSchw (A) ou les virus MVSchw2-SARS-S (B) et MVSchw2-SARS-Ssol (C). Quand les syncytia ont atteint 30 à 40% de confluence (A., B.) ou 90-100% (C), les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées par  
15 des anticorps polyclonaux de lapins anti-SRAS-CoV et un conjugué anti-IgG(H+L) de lapin couplé au FITC (Jackson).

- la figure 43 illustre l'analyse par western blot de l'immunoréactivité de sérums de lapins dirigés contre les peptides E1-12, E53-76 et M2-14. Le lapin 20047 a été immunisé avec le peptide E1-12 couplé à la KLH. Les  
20 lapins 22234 et 22240 ont été immunisés avec le peptide E53-76 couplé à la KLH. Les lapins 20013 et 20080 ont été immunisés avec le peptide M2-14 couplé à la KLH. Les immunsérums ont été analysés par western blot à l'aide d'extraits de cellules infectées par le SRAS-CoV (B) ou à l'aide d'extraits de cellules infectées par un virus recombinant de la vaccine exprimant la protéine E (A) ou M (C) de l'isolat 031589 du SRAS-  
25 CoV. Les immunoempreintes ont été révélées à l'aide d'un conjugué anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham).

La position des protéines E et M est indiquée par une flèche.

Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés  
30 uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**Exemple 1 : Clonage et séquençage du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589**

L'ARN de la souche de SARS-CoV a été extrait à partir du prélèvement de lavage bronchoalvéolaire répertorié sous le numéro 031589, effectué sur un patient de l'hôpital français de Hanoi (Vietnam) atteint de SRAS.

L'ARN isolé a été utilisé comme matrice pour amplifier les ADNc correspondant aux différents cadres ouverts de lecture du génome (ORF 1a, ORF1b, ORF-S, ORF-E, ORF-M, ORF-N (incluant les ORF-13 et ORF-14), ORF3, ORF4, ORF7 à ORF11), et aux extrémités 5' et 3' non-codantes. Les séquences des amorces et des sondes utilisées pour l'amplification/détection ont été définies d'après la séquence nucléotidique disponible du SARS-CoV.

Dans ce qui suit les amorces et les sondes sont identifiées par : la lettre S, suivie d'une lettre qui indique la région correspondante du génome (L pour l'extrémité 5'incluant ORF1a et ORF1b ; S, M et N pour les ORF-S, ORF-M, ORF-N, SE et MN pour les régions intergéniques correspondantes), puis éventuellement de Fn, Rn, avec n inclus entre 1 et 6 correspondant aux amorces utilisées pour la PCR nichée ou imbriquée (paire F1 + R1 pour la première amplification, paire F2 + R2 pour la deuxième amplification, etc...), puis de +/- ou -/- correspondant à une amorce sens ou antisens et enfin des positions des amorces en référence à la séquence Genbank AY27411.3 ; pour les amorces S et N sens et antisens et les autres amorces sens uniquement, lorsqu'une seule position est indiquée elle correspond à celle de l'extrémité 5' d'une sonde ou d'une amorce d'environ 20 bases ; pour les amorces antisens autres que les amorces S et N, lorsqu'une seule position est indiquée elle correspond à celle de l'extrémité 3' d'une sonde ou d'une amorce d'environ 20 bases.

Les produits d'amplifications ainsi générés ont été séquencés à l'aide d'amorces spécifiques afin de déterminer la séquence complète du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589. Ces produits d'amplification, à l'exception de ceux correspondant aux ORF1a et ORF1b, ont ensuite été clonés dans des vecteurs d'expression afin de produire les protéines virales correspondantes et les anticorps dirigés contre ces protéines, notamment par immunisation à base d'ADN.

## 1. Extraction des ARN

Les ARN ont été extraits à l'aide du kit *QIamp viral RNA extraction mini* (QIAGEN) en suivant les recommandations du fabricant. De manière plus précise : 140 µl du prélèvement et 560 µl de tampon AVL ont été mélangés vigoureu-  
5 sement pendant 15 secondes, incubés 10 min à température ambiante puis centrifugés brièvement à vitesse maximale. 560 µl d'éthanol à 100% ont été ajoutés au surnageant et le mélange ainsi obtenu a été agité très vigoureusement pendant 15 sec. 630 µl du mélange ont ensuite été déposés sur la colonne.

La colonne a été placée sur un tube de 2 ml, centrifugée 1 min à  
10 8000 rpm, puis le reste du mélange précédent a été déposé sur la même colonne, centrifugé à nouveau, 1 min à 8000 rpm et la colonne a été transférée sur un tube de 2 ml propre. Ensuite, 500 µl de tampon AW1 ont été ajoutés sur la colonne, puis la colonne a été centrifugée 1 min à 8000 rpm et l'éluat a été éliminé. 500 µl de tampon AW2 ont été ajoutés sur la colonne qui a ensuite été centrifugée 3 min à 14000 rpm et  
15 transférée sur un tube de 1,5 ml. Enfin, 60 µl de tampon AVE ont été ajoutés sur la colonne qui a été incubée 1 à 2 min à température ambiante puis centrifugée 1 min à 8000 rpm. L'éluat correspondant à l'ARN purifié a été récupéré et congelé à -20°C.

## 2. Amplification, séquençage et clonage des ADNc

### 2.1) ADNc codant pour la protéine S

20 Les ARN extraits à partir du prélèvement ont été soumis à une transcription inverse à l'aide d'oligonucléotides hexamériques de séquence aléatoire (pdN6), afin de produire des fragments d'ADNc.

La séquence codant pour la glycoprotéine S du SARS-CoV a été amplifiée sous la forme de deux fragments d'ADN chevauchants : fragment 5'  
25 (SRAS-Sa, SEQ ID NO:5) et fragment 3' (SRAS-Sb, SEQ ID NO:6), en réalisant deux amplifications successives à l'aide d'amorces imbriquées. Les amplicons ainsi obtenus ont été séquencés, clonés dans le vecteur plasmidique PCR 2.1-TOPO™ (IN VITROGEN), puis la séquence des ADNc clonés a été déterminée.

#### a) clonage et séquençage des fragments Sa et Sb

##### 30 a<sub>1</sub>) synthèse de l'ADNc

Le mélange réactionnel contenant : ARN (5 µl) , H<sub>2</sub>O ppi (3,5 µl),  
tampon de transcriptase inverse 5X (4 µl), dNTP 5 mM (2 µl), pdN6 100 ug/ml (4 µl),

RNasin 40 UI/ul (0,5 µl) et transcriptase inverse AMV-RT, 10 UI/ul, PROMEGA (1µl) a été incubé dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : 45 min à 42°C, 15 min à 55°C, 5 min à 95°C, puis l'ADNc obtenu a été maintenu à +4°C.

a<sub>2</sub>) première amplification PCR

5 Les extrémités 5' et 3' du gène S ont été amplifiées respectivement avec les paires d'amorces S/F1/+ 21350-21372 et S/R1/- 23518-23498, S/F3/+ 23258-23277 et S/R3/- 25382-25363. Le mélange réactionnel de 50 µl contenant : ADNc (2 µl), amorces 50 µM (0,5 µl), tampon 10 X (5 µl), dNTP 5 mM (2 µl), Taq Expand High Fidelity, Roche (0,75 µl) et H<sub>2</sub>O (39, 75 µl) a été amplifié dans un  
10 thermocycleur, dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min a été suivie de 40 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 2 min 30 sec, avec 10 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, puis d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min.

15 a<sub>3</sub>) deuxième amplification PCR

Les produits de la première amplification PCR (amplicons 5' et 3') ont subi une seconde étape d'amplification PCR (PCR nichée) dans des conditions identiques à celles de la première amplification, avec les paires d'amorces S/F2/+ 21406-21426 et S/R2/- 23454-23435, et S/F4/+ 23322-23341 et S/R4/- 25348-  
20 25329, respectivement pour l'amplicon 5' et l'amplicon 3'.

a<sub>4</sub>) clonage et séquençage des fragments Sa et Sb

Les amplicons Sa (extrémité 5') et Sb (extrémité 3') ainsi obtenus ont été purifiés à l'aide du kit *QIAquick PCR purification* (QIAGEN), en suivant les recommandations du fabricant, puis ils ont été clonés dans le vecteur PCR2.1-TOPO  
25 (kit Invitrogen), pour donner les plasmides dénommés SRAS-S1 et SRAS-S2.

L'ADN des clones Sa et Sb a été isolé puis l'insert correspondant a été séquencé à l'aide du Kit Big Dye, Applied Biosystem® et des amorces universelles M13 forward et M13 reverse, ainsi que des amorces : S/S/+ 21867, S/S/+ 22353, S/S/+ 22811, S/S/+ 23754, S/S/+ 24207, S/S/+ 24699, S/S/+ 24348,  
30 S/S/- 24209, S/S/- 23630, S/S/- 23038, S/S/- 22454, S/S/- 21815, S/S/- 24784, S/S/+ 21556, S/S/+ 23130 et S/S/+ 24465, en suivant les instructions du fabricant ; les

séquences des fragments Sa et Sb ainsi obtenues correspondent aux séquences SEQ ID NO :5 et SEQ ID NO :6 dans la liste de séquences jointe en annexe.

Le plasmide, dénommé SARS-S1 a été déposé sous le n° I-3020, le 12 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient un fragment 5' de la séquence du gène S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, lequel fragment dénommé Sa correspondant aux nucléotides des positions 21406 à 23454 (SEQ ID NO :5), en référence à la séquence Genbank AY274119.3 Tor2.

10 Le plasmide, dénommé TOP10F'-SARS-S2 a été déposé sous le n° I-3019, le 12 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient un fragment 3' de la séquence du gène S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, lequel fragment  
15 dénommé Sb correspondant aux nucléotides des positions 23322 à 25348 (SEQ ID NO : 6), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

b) clonage et séquençage de l'ADNc complet (clone SRAS-S de 4 kb)

L'ADNc S complet a été obtenu à partir des clones SARS-S1 et SARS-S2 précités, de la façon suivante :

20 1) une réaction d'amplification PCR a été réalisée sur un clone SARS-S2 en présence de l'amorce S/R4/-/25348-25329 précitée et de l'amorce S/S/+/24696-24715: un amplicon de 633 pb a été obtenu,

2) une autre réaction d'amplification PCR a été réalisée sur un autre clone SARS-S2, en présence des amorces S/F4/+/23322-23341 précitée et S/S/-  
25 /24803-24784: un amplicon de 1481 pb a été obtenu,

La réaction d'amplification a été réalisée dans les conditions telles que définies ci-dessus pour l'amplification des fragments Sa et Sb, à l'exception que 30 cycles d'amplifications comprenant une étape de dénaturation à 94° C pendant 20 sec et une étape d'élongation à 72° C pendant 2 min 30 sec ont été effectués.

30 3) les 2 amplicons (633 pb et 1481 pb) ont été purifiés dans les conditions telles que définies ci-dessus pour les fragments Sa et Sb.

4) une autre réaction d'amplification PCR à l'aide des amorces S/F4+/23322-23341 et S/R4-/25348-25329 précitées, a été réalisée sur les amplicons purifiés obtenus en 3). La réaction d'amplification a été réalisée dans les conditions telles que définies ci-dessus pour l'amplification des fragments Sa et Sb, à l'exception  
5 que 30 cycles d'amplifications ont été effectués.

L'amplicon de 2026 pb ainsi obtenu a été purifié, cloné dans le vecteur PCR2.1-TOPO puis séquencé comme ci-dessus, à l'aide des amorces telles que définies ci-dessus pour les fragments Sa et Sb. Le clone ainsi obtenu a été dénommé clone 3'.

10 5) Le clone SARS-S1 précédemment obtenu et le clone 3' ont été digérés par *EcoR I*, les bandes d'environ 2kb ainsi obtenues ont été purifiées sur gel puis amplifiées par PCR avec les amorces S/F2+/21406-21426 et S/R4-/25348-25329 précitées. La réaction d'amplification a été réalisée dans les conditions telles que définies ci-dessus pour l'amplification des fragments Sa et Sb, à l'exception que  
15 30 cycles d'amplifications ont été effectués. L'amplicon d'environ 4 kb a été purifié et séquencé. Il a ensuite été cloné dans le vecteur PCR2.1-TOPO pour donner le plasmide, dénommé SARS-S, et l'insert contenu dans ce plasmide a été séquencé comme ci-dessus, à l'aide des amorces telles que définies ci-dessus pour les fragments Sa et Sb. Les séquences d'ADNc de l'insert et de l'amplicon codant pour la protéine  
20 S, correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 4 et SEQ ID NO : 2 dans la liste de séquences jointe en annexe, elles codent pour la protéine S (SEQ ID NO : 3).

La séquence de l'amplicon correspondant à l'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 présente les  
25 deux mutations suivantes par rapport aux séquences correspondantes de respectivement les isolats Tor2 et Urbani, les positions des mutations étant indiquées en référence à la séquence complète du génome de l'isolat Tor2 (Genbank AY274119.3) :

- g/t en position 23220 ; le codon alanine (gct) en position 577 de la séquence en acides aminés de la protéine S de Tor2 est remplacé par un codon sérine  
30 (tct),

- c/t en position 24872 : cette mutation ne modifie pas la séquence en acides aminés de la protéine S, et

Le plasmide, dénommé SARS-S, a été déposé sous le n° I-3059, le 20 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le  
5 n° 031589, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 21406 à 25348 (SEQ ID NO :4), en référence à la séquence Genbank AY274119.3.

## 2.2) ADNc codant pour les protéines M et E

Les ARN issus du prélèvement 031589, extraits comme ci-dessus, ont été soumis à une transcription inverse, associée, lors de la même étape (kit *Titan*  
10 *One Step RT-PCR*®, Roche), à une réaction d'amplification par PCR, à l'aide des couples d'amorces :

- S/E/F1/+ /26051-26070 et S/E/R1/- /26455-26436 pour amplifier l'ORF-E, et
- S/M/F1/+ /26225-26244 et S/M/R1/- /27148-27129 pour amplifier l'ORF-M.

Un premier mélange réactionnel contenant : 8,6 µl d'H<sub>2</sub>Oppi, 1 µl de  
15 dNTP (5mM), 0,2 µl de chacune des amorces (50µM), 1,25 µl de DTT (100mM) et 0,25 µl de RNAsin (40UI/µl) a été combiné avec un deuxième mélange réactionnel contenant : 1 µl d'ARN, 7 µl d'H<sub>2</sub>Oppi, 5 µl de tampon de RT-PCR 5X et 0,5 µl de mélange d'enzyme et les mélanges combinés ont été incubés dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : 30 min à 42°C, 10 min à 55°C, 2 min à 94°C suivi de  
20 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 sec, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 sec et une étape d'élongation à 68°C pendant 45 sec, avec 3 sec d'incrément par cycle et enfin une étape d'élongation terminale à 68°C pendant 7 min.

Les produits d'amplification ainsi obtenus (amplicons M et E) ont  
25 subi une deuxième amplification PCR (PCR nichée) en utilisant le kit Expand High-Fi®, Roche), à l'aide des couples d'amorces :

- S/E/F2/+ /26082-26101 et S/E/R2/- /26413-26394 pour l'amplicon E, et
- S/M/F2/+ /26330-26350 et S/M/R2/- /27098-27078 pour l'amplicon M.

Le mélange réactionnel contenant : 2 µl du produit de la première PCR, 39,25 µl  
30 d'H<sub>2</sub>Oppi, 5 µl de tampon 10X contenant du MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de dNTP (5mM), 0,5µl de chacune des amorces (50 µM) et 0,75µl de mélange d'enzyme a été incubé dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation à 94°C



pendant 2 min a été suivie de 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 sec et une étape d'élongation à 72°C pendant 45 sec, avec 3 sec d'incrément par cycle, et enfin une étape d'élongation terminale à 72°C pendant 7 min. Les produits d'amplification  
5 obtenus correspondant aux ADNc codant pour les protéines E et M ont été séquencés comme ci-dessus, à l'aide des amorces : S/E/F2/+ /26082 et S/E/R2/- /26394, S/M/F2/+ /26330, S/M/R2/- /27078 précitées et des amorces S/M/+ /26636-26655 et S/M/- /26567-26548. Ils ont ensuite été clonés, comme ci-dessus, pour donner les plasmides dénommés SARS-E et SARS-M. L'ADN de ces clones a ensuite été isolé et  
10 séquencé à l'aide des amorces universelles M13 forward et M13 reverse ainsi que des amorces S/M/+ /26636 et S/M/- /26548 précitées.

La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc codant pour la protéine E (SEQ ID NO : 13) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes  
15 des isolats AY274119.3-Tor2 et AY278741-Urbani. La séquence de la protéine E de la souche de SARS-CoV 031589 correspond à la séquence SEQ ID NO : 14 dans la liste de séquences jointe en annexe.

Le plasmide, dénommé SARS-E a été déposé sous le n° I-3046, le 28 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25  
20 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant pour la protéine E de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26082 à 26413 (SEQ ID NO :15), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

25 La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc codant pour la M (SEQ ID NO :16) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY274119.3-Tor2. En revanche, en position 26857, l'isolat AY278741-Urbani comporte un c et la séquence de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement réper-  
30 torié sous le n°031589 un t. Cette mutation aboutit à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondante: en position 154, une proline (AY278741-Urbani) est changée en sérine dans la souche de SARS-CoV issue du

prélèvement répertorié sous le n°031589. La séquence de la protéine M de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n°031589 correspond à la séquence SEQ ID NO :17 dans la liste de séquences jointe en annexe.

Le plasmide, dénommé SARS-M a été déposé sous le n° I-3047, le  
5 28 mai 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25  
rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc codant  
pour la protéine M de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le  
n° 031589, telle que définie ci-dessus ; laquelle séquence correspondant aux  
nucléotides des positions 26330 à 27098 (SEQ ID NO :18), en référence à la séquence  
10 Genbank n° d'accès AY274119.3.

### 2.3) ADNc correspondant aux ORF3, ORF4, ORF7 à ORF11

La même stratégie d'amplification, de clonage et de séquençage a été  
utilisée pour obtenir les fragments d'ADNc correspondant respectivement aux ORF  
suivantes : ORF 3, ORF4, ORF7, ORF8, ORF9, ORF10 et ORF11. Les couples  
15 d'amorces utilisées pour la première amplification sont :

- ORF3 et ORF4 : S/SE/F1/+ /25069-25088 et S/SE/R1/- /26300-26281
- ORF7 à ORF11 : S/MN/F1/+ /26898-26917 et S/MN/R1/- /28287-28266

Les couples d'amorces utilisées pour la deuxième amplification sont :

- ORF3 et ORF4 : S/SE/F2/+ /25110-25129 et S/SE/R2/- /26244-26225
- 20 - ORF7 à ORF11 : S/MN/F2/+ /26977-26996 et S/MN/R2/- /28218-28199

Les conditions de la première amplification (RT-PCR) sont les  
suivantes : 45 min à 42°C, 10 min à 55°C, 2 min à 94°C suivi de 40 cycles compre-  
nant une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 58°C  
pendant 30 sec et une étape d'élongation à 68°C pendant 1 min, avec 5 sec d'incrément  
25 par cycle et enfin une étape d'élongation terminale à 68°C pendant 7 min.

Les conditions de la PCR nichée sont les suivantes : une étape de dénaturation à 94°C  
pendant 2 min a été suivie de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C  
pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 58°C pendant 30 sec et une étape  
d'élongation à 72°C pendant 50 sec, avec 4 sec d'incrément par cycle et enfin une  
30 étape d'élongation terminale à 72°C pendant 7 min.

Les produits d'amplification obtenus correspondant aux ADNc  
contenant respectivement les ORF3 et 4 et les ORF7 à 11 ont été séquencés à l'aide

des amorces : S/SE+/25363, S/SE+/25835, S/SE-/25494, S/SE-/25875, S/MN+/27839, S/MN+/27409, S/MN-/27836 S/MN-/27799 et clonés comme ci-dessus pour les autres ORF, pour donner les plasmides dénommés SARS-SE et SARS-MN. L'ADN de ces clones a été isolé et séquencé à l'aide de ces mêmes  
5 amorces et des amorces universelles M13 sens et M13 anti-sens.

La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc de la région contenant les ORF 3 et 4 (SEQ ID NO :7) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 comporte une différence nucléotidique par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY274119-Tor2. Cette mutation en position 25298 aboutit à une  
10 modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondante (ORF 3): en position 11, une arginine (AY274119-Tor2) est changée en glycine dans la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589. En revanche, aucune mutation n'a été identifiée par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY278741-Urbani. Les séquences des ORF 3 et 4 la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589  
15 correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO :10 et 12 dans la liste de séquences jointe en annexe.

Le plasmide, dénommé SARS-SE a été déposé sous le n° I-3126, le  
13 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient  
20 l'ADNc correspondant à la région située entre l'ORF-S et l'ORF-E et chevauchant l'ORF-E de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle région correspondant aux nucléotides des positions 25110 à 26244 (SEQ ID NO :8), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3,

25 La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc correspondant à la région contenant les ORF7 à ORF11 (SEQ ID NO :19) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119-Tor2 et AY278741-Urbani. Les séquences des ORF7 à 11 de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589  
30 correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 22, 24, 26, 28 et 30 dans la liste de séquences jointe en annexe.

Le plasmide dénommé SARS-MN a été déposé sous le n° I-3125, le 13 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient la séquence d'ADNc correspondant à la région située entre l'ORF-M et l'ORF-N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589 et prélevée à Hanoi, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 26977 à 28218 (SEQ ID NO :20 ), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc correspondant à la région contenant les ORF7 à ORF11 (SEQ ID NO :19) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119-Tor2 et AY278741-Urbani. Les séquences des ORF7 à 11 de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 22, 24, 26, 28 et 30 dans la liste de séquences jointe en annexe.

#### **2.4) ADNc codant pour la protéine N et incluant les ORF13 et ORF14**

L'ADNc a été synthétisé et amplifié comme décrit ci-dessus pour les fragments Sa et Sb. De manière plus précise, le mélange réactionnel contenant : 5 µl d'ARN, 5 µl d'H<sub>2</sub>O ppi 4 µl de tampon de reverse transcriptase 5X, 2 µl de dNTP (5 mM), 2 µl d'oligo 20T (5 µM), 0,5 µl de RNasin (40 UI/ul) et 1, 5 µl de AMV-RT (10 UI/ul Promega) a été incubé dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : 45 min à 42°C, 15 min à 55°C, 5 min à 95°C, puis il a été maintenu à +4°C.

Une première amplification PCR a été réalisée avec la paire d'amorces S/N/F3+/28023 et S/N/R3-/29480.

Le mélange réactionnel comme ci-dessus pour l'amplification des fragments S1 et S2 a été incubé dans un thermocycleur, dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min a été suivie de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min 30 sec avec 10 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, puis d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min.

L'amplicon obtenu à la première amplification PCR a subi une seconde étape d'amplification PCR (PCR nichée) avec la paires d'amorce S/N/F4/+ /28054 et S/N/R4/- /29430 dans des conditions identiques à celles de la première amplification.

5 Le produit d'amplification obtenu correspondant à l'ADNc codant pour la protéine N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589a été séquencé à l'aide des amorces : S/N/F4/+ /28054, S/N/R4/- /29430, S/N/+ /28468, S/N/+ /28918 et S/N/- /28607 et cloné comme ci-dessus pour les autres ORF, pour donner le plasmide dénommé SARS-N. L'ADN de ces clones a été isolé et séquencé à  
10 l'aide des amorces universelles M13 sens et M13 anti-sens, ainsi que des amorces S/N/+ /28468, S/N/+ /28918 et S/N/- /28607.

La séquence de l'amplicon représentant l'ADNc correspondant à l'ORF-N et incluant les ORF13 et ORF14 (SEQ ID NO :36) de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 ne comporte pas de différences par rapport aux  
15 séquences correspondantes des isolats AY274119.3-Tor2 et AY278741-Urbani. La séquence de la protéine N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 correspond à la séquence SEQ ID NO : 37 dans la liste de séquences jointe en annexe.

Les séquences des ORF13 et 14 de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement n°031589 correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 32  
20 et 34 dans la liste de séquences jointe en annexe.

Le plasmide dénommé SARS-N a été déposé sous le n° I-3048, le 5 juin 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient l'ADNc codant pour la protéine N de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle  
25 que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 28054 à 29430 (SEQ ID NO :38), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

## **2.5) extrémités 5' et 3' non-codantes**

### **a) extrémité 5' non-codante (5'NC)**

30 a<sub>1</sub>) synthèse de l'ADNc

Les ARN issus du prélèvement 031589, extraits comme ci-dessus, ont été soumis à une transcription inverse dans les conditions suivantes :

L'ARN (15 µl) et l'amorce S/L/-/443 (3 µl à la concentration de 5µM, ont été incubés 10 min à 75°C.

Ensuite, du Tampon de transcriptase inverse 5X (6 µl, INVITROGEN), des dNTP 10 mM (1 µl), du DTT 0,1M (3 µl) ont été ajoutés et le  
5 mélange a été incubé à 50°C pendant 3 min.

Enfin la transcriptase inverse (3 µl de Superscript®, INVITROGEN) a été ajoutée au mélange précédent qui a été incubé à 50°C pendant 1h30 puis à 90 °C pendant 2 min.

L'ADNc ainsi obtenu a été purifié à l'aide du kit *QIAquick PCR purification* (QIAGEN), selon les recommandations du fabricant.

b<sub>1</sub>) Réaction à la Terminal Transferase (TdT)

L'ADNc (10 µl) est incubé 2 min à 100°C, conservé dans la glace, puis sont ajoutés : H<sub>2</sub>O (2,5 µl), tampon TdT 5X (4 µl, AMERSHAM), dATP 5mM (2 µl) et TdT (1,5 µl, AMERSHAM). Le mélange ainsi obtenu est incubé 45 min à  
15 37°C puis 2 min à 65°C.

Le produit obtenu est amplifié par une première réaction PCR à l'aide des amorces : S/L/-/225-206 et ancre 14T : 5'-AGATGAATTCGGTACCTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID NO :68). Les conditions de l'amplification sont les suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min est suivie de 10 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 sec, une étape d'hybridation à 45°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec puis de 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 sec, une étape d'hybridation à 50°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec, puis d'une étape finale d'élongation à  
25 72°C pendant 5 min.

Le produit de la première amplification PCR a subi une seconde étape d'amplification à l'aide des amorces : S/L/-/204-185 et ancre 14T précitée dans des conditions identiques à celles de la première amplification. L'amplicon ainsi obtenu a été purifié, séquencé à l'aide de l'amorce S/L/-/182-163 puis il a été cloné  
30 comme ci-dessus pour les différentes ORF, pour donner le plasmide dénommé SARS-

5'NC. L'ADN de ce clone a été isolé et séquencé à l'aide des amorces universelles M13 sens et M13 anti-sens et de l'amorce S/L/-/182-163 précitée.

L'amplicon représentant l'ADNc correspondant à l'extrémité 5'NC de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589 correspond à la séquence SEQ ID NO : 72 dans la liste de séquences jointe en annexe ;  
5 cette séquence ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119.3-Tor2 et AY278741-Urbani.

Le plasmide dénommé SARS-5'NC a été déposé sous le n° I- 3124, le 7 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de  
10 Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 ; il contient l'ADNc correspondant à l'extrémité 5'non codante du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant aux nucléotides des positions 1 à 204 (SEQ ID NO :39 ), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3.

15 b) extrémité 3'non-codante (3'NC)

a<sub>1</sub>) synthèse de l'ADNc

Les ARN issus du prélèvement 031589, extraits comme ci-dessus, ont été soumis à une transcription inverse, selon le protocole suivant : le mélange réactionnel contenant : ARN (5 µl), H<sub>2</sub>O (5 µl), tampon de transcriptase inverse 5X (4  
20 µl), dNTP 5 mM (2 µl), Oligo 20T 5µM (2 µl), RNasin 40 U/ µl (0,5 µl) et RT-AMV 10 UI/ µl (1,5 µl, PROMEGA) a été incubé dans un thermocycleur, dans les conditions suivantes : 45 min à 42°C, 15 min à 55°C, 5 min à 95°C, puis il a été maintenu à +4°C.

L'ADNc obtenu a été amplifié par une première réaction PCR à  
25 l'aide des amorces S/N/+ /28468-28487 et ancre 14T précitée. Les conditions de l'amplification sont les suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min est suivie de 10 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 45°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 50 sec puis de 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C  
30 pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 50°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 50 sec, puis d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min.

Le produit de la première amplification PCR a subi une seconde étape d'amplification à l'aide des amorces S/N/+28933-28952 et ancre 14T précitée, dans des conditions identiques à celles de la première amplification. L'amplicon ainsi obtenu a été purifié, séquencé à l'aide de l'amorce S/N/+29257-29278 et cloné  
5 comme ci-dessus pour les différentes ORF, pour donner le plasmide dénommé SARS-3'NC. L'ADN de ce clone a été isolé et séquencé à l'aide des amorces universelles M13 sens et M13 anti-sens et de l'amorce S/N/+29257-29278 précitée.

L'amplicon représentant l'ADNc correspondant à l'extrémité 3'NC de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589 correspond à la séquence SEQ ID NO :73 dans la liste de séquences jointe en annexe ; cette  
10 séquence ne comporte pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats AY274119.3-Tor2 et AY278741-Urbani.

Le plasmide dénommé SARS-3'NC a été déposé sous le n° I-3123 le 7 novembre 2003, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes,  
15 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15. ; il contient la séquence d'ADNc correspondant à l'extrémité 3'non codante du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, telle que définie ci-dessus, laquelle séquence correspondant à celle située entre le nucléotide en position 28933 à 29272 (SEQ ID NO :40), en référence à la séquence Genbank n° d'accès AY274119.3, se  
20 termine par une série de nucléotides a.

## **2.6) ORF1a et ORF1b**

L'amplification de la région 5' contenant les ORF1a et ORF1b du génome du SARS-CoV issu du prélèvement 031589 a été réalisée en pratiquant des réactions de RT-PCR suivies de PCR nichées selon les mêmes principes que ceux  
25 précédemment décrits pour les autres ORF. Les fragments amplifiés sont chevauchants sur plusieurs dizaines de bases, permettant ainsi la reconstruction informatique de la séquence complète de cette partie du génome. En moyenne, les fragments amplifiés sont de deux kilobases.

14 fragments chevauchants dénommés L0 à L12 ont ainsi été  
30 amplifiés à l'aide des amorces suivantes :



**Tableau II: Amorces utilisées pour l'amplification  
de la région 5'(ORF1a et ORF1b)**

REGION AMPLIFIEE ET SEQUENCEE (ne tient pas compte des amorces)	Amorce sens RT-PCR	Amorce antisens RT-PCR	Amorce sens PCR nichée	Amorce antisens PCR nichée
L0 50-480	S/L0/F1/+30	S/L0/R1/-481		
L1 231-2240	S/L1/F1/+147	S/L1/R1/-2336	S/L1/F2/+211	S/L1/R2/-2241
L2 2156-4167	S/L2/F1/+2033	S/L2/R1/-4192	S/L2/F2/+2136	S/L2/R2/-4168
L3 3913-5324	S/L3bis/F1/+3850	S/L3bis/R1/-5365	S/L3bis/F2/+3892	S/L3bis/R2/-5325
L4b 4952-6023	S/L4b/F1/+4878	S/L4b/R1/-6061	S/L4b/F2/+4932	S/L4b/R2/-6024
L4 5325-7318	S/L4/F1/+5272	S/L4/R1/-7392	S/L4/F2/+5305	S/L4/R2/-7323
L5 7296-9156	S/L5/F1/+7111	S/L5/R1/-9253	S/L5/F2/+7275	S/L5/R2/-9157
L6 9053-11066	S/L6/F1/+8975	S/L6/R1/-11151	S/L6/F2/+9032	S/L6/R2/-11067
L7 10928-12962	S/L7/F1/+10883	S/L7/R1/-13050	S/L7/F2/+10928	S/L7/R2/-12963
L8 12835-14834	S/L8/F1/+12690	S/L8/R1/-14857	S/L8/F2/+12815	S/L8/R2/-14835
L9 14765-16624	S/L9/F1/+14688	S/L9/R1/-16678	S/L9/F2/+14745	S/L9/R2/-16625
L10 16534-18570	S/L10/F1/+16451	S/L10/R1/-18594	S/L10/F2/+16514	S/L10/R2/-18571
L11 18521-20582	S/L11/F1/+18441	S/L11/R1/-20612	S/L11/F2/+18500	S/L11/R2/-20583
L12 20338-22205	S/L12/F1/+20279	S/L12/R1/-22229	S/L12/F2/+20319	S/L12/R2/-22206

Tous les fragments ont été amplifiés dans les conditions suivantes, excepté le fragment L0 qui a été amplifié comme décrit ci-dessus pour l'ORF-M :

- 5                   - RT-PCR: 30 min à 42°C, 15 min à 55°C, 2 min à 94°C, puis l'ADNc obtenu est amplifié dans les conditions suivantes : 40 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 58°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 68°C pendant 1 min 30 sec, avec 5 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, puis une étape finale d'élongation à 68°C pendant 7 min.

- 10                   - PCR nichée : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 min est suivie de 35 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min 30 sec, avec 5 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, puis une étape finale d'élongation à 72°C pendant 7 min.
- 15

Les produits d'amplifications ont été séquencés à l'aide des amorces définies dans le Tableau III ci-après :

**Tableau III : Amorces utilisées pour le séquençage de la région 5' (ORF1a et ORF1b)**

5

Noms	Séquences (SEQ ID NO : 76 à 139)
S/L3/+4932	5'-CCACACACAGCTTGTGGATA-3'
S/L4/+6401	5'-CCGAAGTTGTAGGCAATGTC-3'
S/L4/+6964	5'-TTTGGTGCTCCTTCTTATTG-3'
S/L4/-6817	5'-CCGGCATCCAAACATAATTT-3'
S/L5/-7633	5'-TGGTCAGTAGGGTTGATTGG-3'
S/L5/-8127	5'-CATCCTTTGTGTCAACATCG-3'
S/L5/-8633	5'-GTCACGAGTGACACCATCCT-3'
S/L5/+7839	5'-ATGCGACGAGTCTGCTTCTA-3'
S/L5/+8785	5'-TTCATAGTGCCTGGCTTACC-3'
S/L5/+8255	5'-ATCTTGGCGCATGTATTGAC-3'
S/L6/-9422	5'-TGCATTAGCAGCAACAACAT-3'
S/L6/-9966	5'-TCTGCAGAACAGCAGAAGTG-3'
S/L6/-10542	5'-CCTGTGCAGTTTGTCTGTCA-3'
S/L6/+10677	5'-CCTTGTGGCAATGAAGTACA-3'
S/L6/+10106	5'-ATGTCATTTGCACAGCAGAA-3'
S/L6/+9571	5'-CTTCAATGGTTTGCCATGTT-3'
S/L7/-11271	5'-TGCGAGCTGTCATGAGAATA-3'
S/L7/-11801	5'-AACCGAGAGCAGTACCACAG-3'
S/L7/-12383	5'-TTTGGCTGCTGTAGTCAATG-3'
S/L7/+12640	5'-CTACGACAGATGTCCTGTGC-3'
S/L7/+12088	5'-GAGCAGGCTGTAGCTAATGG-3'
S/L7/+11551	5'-TTAGGCTATTGTTGCTGCTG-3'
S/L8/-13160	5'-CAGACAACATGAAGCACCAC-3'
S/L8/-13704	5'-CGCTGACGTGATATATGTGG-3'
S/L8/-14284	5'-TGCACAATGAAGGATACACC-3'
S/L8/+14453	5'-ACATAGCTCGCGTCTCAGTT-3'
S/L8/+13968	5'-GGCATTGTAGGCGTACTGAC-3'
S/L8/+13401	5'-GTTTGCGGTGTAAGTGACAG-3'
S/L9/-15098	5'-TAGTGGCGGCTATTGACTTC-3'
S/L9/-15677	5'-CTAAACCTTGAGCCGCATAG-3'
S/L9/-16247	5'-CATGGTCATAGCAGCACTTG-3'
S/L9/+16323	5'-CCAGGTTGTGATGTCACTGAT-3'
S/L9/+15858	5'-CCTTACCCAGATCCATCAAG-3'
S/L9/+15288	5'-CGCAAACATAACACTTGCTG-3'
S/L10/-16914	5'-AGTGTTGGGTACAAGCCAGT-3'
S/L10/-17466	5'-GTTCCAAGGAACATGTCTGG-3'
S/L10/-18022	5'-AGGTGCCTGTGTAGGATGAA-3'
S/L10/+18245	5'-GGGCTGTCATGCAACTAGAG-3'
S/L10/+17663	5'-TCTTACACGCAATCCTGCTT-3'
S/L10/+17061	5'-TACCCATCTGCTCGCATAGT-3'
S/L11/-18877	5'-GCAAGCAGAATTAACCCTCA-3'
S/L11/-19396	5'-AGCACCACCTAAATTGCATC-3'
S/L11/-20002	5'-TGGTCCCTTTGAAGGTGTTA-3'
S/L11/+20245	5'-TCGAACACATCGTTTATGGA-3'
S/L11/+19611	5'-GAAGCACCTGTTTCCATCAT-3'
S/L11/+19021	5'-ACGATGCTCAGCCATGTAGT-3'
SARS/L1/F3/+800	5'-GAGGTGCAGTCACTCGCTAT-3'
SARS/L1/F4/+1391	5'-CAGAGATTGGACCTGAGCAT-3'

SARS/L1/F5/+1925	5'-CAGCAAACCACTCAATTCCT-3'
SARS/L1/R3/-1674	5'-AAATGATGGCAACCTCTTCA-3'
SARS/L1/R4/-1107	5'-CACGTGGTTGAATGACTTTG-3'
SARS/L1/R5/-520	5'-ATTTCTGCAACCAGCTCAAC-3'
SARS/L2/F3/+2664	5'-CGCATTGTCTCCTGGTTTAC-3'
SARS/L2/F4/+3232	5'-GAGATTGAGCCAGAACCAGA-3'
SARS/L2/F5/+3746	5'-ATGAGCAGGTTGTCATGGAT-3'
SARS/L2/R3/-3579	5'-CTGCCTTAAGAAGCTGGATG-3'
SARS/L2/R4/-2991	5'-TTTCTTCACCAGCATCATCA-3'
SARS/L2/R5/-2529	5'-CACCGTTCTTGAGAACAACC-3'
SARS/L3/F3/+4708	5'-TCTTTGGCTGGCTCTTACAG-3'
SARS/L3/F4/+5305	5'-GCTGGTGATGCTGCTAACTT-3'
SARS/L3/F5/+5822	5'-CCATCAAGCCTGTGTCGTAT-3'
SARS/L3/R3/-5610	5'-CAGGTGGTGACAGACATCATA-3'
SARS/L3/R4/-4988	5'-AACATCAGCACCATCCAAGT-3'
SARS/L3/R5/-4437	5'-ATCGGACACCATAGTCAACG-3'

Les séquences des fragments L0 à L12 de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le n° 031589, correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO :41 à SEQ ID NO :54 dans la liste de séquences jointe en annexe. Parmi ces séquences, seule celle correspondant aux fragments L5 comporte une différence nucléotidique par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY278741-Urbani. Cette mutation t/c en position 7919 aboutit à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondante, codée par l'ORF 1a: en position 2552, une valine (codon gtt ; AY278741) est changée en alanine (codon gct) dans la souche de SARS-CoV 031589. En revanche, aucune mutation n'a été identifiée par rapport à la séquence correspondante de l'isolat AY274119.3-Urbani. Les autres fragments ne présentent pas de différences par rapport aux séquences correspondantes des isolats Tor2 et Urbani.

**Exemple 2 : Production et purification de protéines N et S recombinantes de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589**

La protéine entière N et deux fragments polypeptidiques de la protéine S de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589 ont été produites chez *E. coli*, sous forme de protéines de fusion comprenant une étiquette polyhistidine N-ou C-terminale. Dans les deux polypeptides S, les séquences hydrophobes N et C-terminales de la protéine S (peptide signal : positions 1 à 13 et hélice transmembranaire : positions 1196 à 1218) ont été délétées alors que l'hélice  $\beta$  (positions 565 à 687) et les deux motifs de type coiled-coils (positions 895 à 980 et 1155 à 1186) de la protéine S ont été préservés. Ces deux polypeptides sont

constitués par : un fragment long ( $S_L$ ) correspondant aux positions 14 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S et un fragment court ( $S_C$ ) correspondant aux positions 475 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S.

### 1) Clonage des ADNc N, $S_L$ et $S_C$ dans les vecteurs d'expression pIVEX2.3 et

#### 5 pIVEX2.4

Les ADNc correspondant à la protéine N et aux fragments  $S_L$  et  $S_C$  ont été amplifiés par PCR dans des conditions standard, à l'aide de l'ADN polymérase Platinum Pfx® (INVITROGEN). Les plasmides SRAS-N et SRAS-S ont été utilisés comme matrice et les oligonucléotides suivants comme amorces :

- 10 5'-CCCATATGCTCTGATAATGGACCCCAATCAAAC-3' (N sens, SEQ ID NO :55)  
 5'-CCCCCGGGTGCCTGAGTTGAATCAGCAGAAGC-3' (N antisens, SEQ ID NO :56)  
 5'-CCCATATGAGTGACCTTGACCGGTGCACCAC-3' ( $S_C$  sens, SEQ ID NO :57)  
 5'-CCCATATGAAACCTTGACCCACCTGCTC-3' ( $S_L$  sens, SEQ ID NO :58)  
 5'-CCCCCGGGTTTAATATATTGCTCATATTTTCCC-3' ( $S_C$  et  $S_L$  antisens, SEQ ID  
 15 NO :59).

- Les amorces sens introduisent un site *NdeI* (souligné) alors que les amorces antisens introduisent un site *XmaI* ou *SmaI* (souligné). Les 3 produits d'amplification ont été purifiés sur colonne (kit *QIAquick PCR Purification*, QIAGEN) et clonés dans un vecteur approprié. L'ADN plasmidique purifié des 3 constructions  
 20 (kit *QIAfilter Midi Plasmid*, QIAGEN) a été vérifié par séquençage et digéré par les enzymes *NdeI* et *XmaI*. Les 3 fragments correspondants aux ADNc N,  $S_L$  et  $S_C$  ont été purifiés sur gel d'agarose puis insérés dans les plasmides pIVEX2.3MCS (étiquette polyhistidine C-terminale) et pIVEX2.4d (étiquette polyhistidine N-terminale) préalablement digérés par les mêmes enzymes. Après vérification des constructions, les 6  
 25 vecteurs d'expressions ainsi obtenus (pIV2.3N, pIV2.3 $S_C$ , pIV2.3 $S_L$ , pIV2.4N, pIV2.4 $S_C$  également dénommé pIV2.4 $S_I$ , pIV2.4 $S_L$ ) ont été ensuite utilisés, d'une part pour tester l'expression des protéines *in-vitro*, et d'autre part pour transformer la souche bactérienne BL21(DE3)pDIA17 (NOVAGEN). Ces constructions codent pour des protéines dont la masse moléculaire attendue est la suivante : pIV2.3N (47174  
 30 Da), pIV2.3 $S_C$  (82897 Da), pIV2.3 $S_L$  (132056 Da), pIV2.4N (48996 Da), pIV2.4 $S_I$  (81076 Da) et pIV2.4 $S_L$  (133877 Da). Des bactéries transformées par pIV2.3N ont été déposées à la CNCM le 23 octobre 2003, sous le numéro I-3117, et des bactéries

transformées par pIV2.4S<sub>1</sub> ont été déposées à la CNCM le 23 octobre 2003, sous le numéro I-3118.

## 2) Analyse de l'expression des protéines recombinantes *in-vitro* et *in vivo*

L'expression de protéines recombinantes à partir des 6 vecteurs  
5 recombinants a été testée, dans un premier temps, dans un système *in-vitro* (RTS100, Roche). Les protéines produites *in vitro*, après une incubation des vecteurs recombinants pIVEX, 4h à 30°C, dans le système RTS100, ont été analysées par western-blot à l'aide d'un anticorps anti-(his)<sub>6</sub> couplé à la peroxydase. Le résultat d'expression *in-vitro* (Figure 1) montre que seule la protéine N est exprimée en quantités importantes,  
10 cela quelle que soit la position, N- ou C-terminale, de l'étiquette polyhistidine. Dans une seconde étape, l'expression des protéines N et S a été testée *in-vivo* à 30°C dans du milieu LB, en présence ou en l'absence d'inducteur (IPTG 1mM). La protéine N est très bien produite dans ce système bactérien (Figure 2) et se retrouve principalement dans une fraction soluble après lyse des bactéries. En revanche, la version longue  
15 de S (S<sub>L</sub>) est très peu produite et complètement insoluble (Figure 3). La version courte (S<sub>C</sub>) présente également une très faible solubilité, mais un taux d'expression beaucoup plus élevé que celui de la version longue. Par ailleurs, la construction S<sub>C</sub> fusionnée à une étiquette polyhistidine en position C-terminale présente une taille plus faible que celle attendue. Une expérience d'immunodétection avec un anticorps anti-poly-  
20 histidine a montré que cette construction était incomplète. En conclusion, les deux constructions, pIV2.3N et pIV2.4S<sub>1</sub>, exprimant respectivement la protéine N entière fusionnée à l'étiquette polyhistidine en C-terminal et la protéine S courte fusionnée à l'étiquette polyhistidine en N-terminal, ont été retenues pour produire les deux protéines en grande quantité afin de les purifier. Les plasmides pIV2.3N et pIV2.4S<sub>1</sub>  
25 ont été déposés respectivement sous le n° I-3117 et I-3118 auprès de la CNCM, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS 15, le 23 octobre 2003.

## 3) Analyse de l'activité antigénique des protéines recombinantes

L'activité antigénique des protéines N, S<sub>L</sub> et S<sub>C</sub> a été testée par western-blot, à l'aide de deux échantillons de sérum, provenant d'un même patient  
30 infecté par le SARS-CoV, prélevés 8 jours (M12) et 29 jours-(M13) après le début des symptômes du SRAS. Le protocole expérimental est comme décrit à l'exemple 3. Les

résultats illustrés par la figure 4 montrent (i) la séroconversion du patient, et (ii) que la protéine N possède une plus forte réactivité antigénique que la protéine S courte.

#### 4) Purification de la protéine N à partir de pIV2.3N

Plusieurs expériences de purification de la protéine N, produite à partir du vecteur pIV2.3N, ont été réalisées selon le protocole suivant. Les bactéries BL21(DE3)pDIA17, transformées par le vecteur d'expression pIV2.3N, ont été cultivées à 30°C dans 1 litre de milieu de culture contenant 0,1 mg/ml d'ampicilline, et induites par 1 mM IPTG quand la densité cellulaire, équivalente à  $A_{600} = 0,8$ , est atteinte (environ 3 heures). Après 2 heures de culture en présence d'inducteur, les cellules ont été récupérées par centrifugation (10 min à 5000 rpm), remises en suspension dans le tampon de lyse (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , NaCl 0,3 M, 20 mM imidazole, pH 8 contenant le mélange d'inhibiteurs de protéases *Complete®*, Roche), et lysées par la presse de French (12000 psi). Après centrifugation du lysat bactérien (15 min à 12000 rpm), le surnageant (50 ml) a été déposé à un débit de 1ml/min sur une colonne (15 ml) de chélation métallique (Ni-NTA superflow, Qiagen), équilibrée par le tampon de lyse. Après lavage de la colonne par 200 ml de tampon de lyse, la protéine N a été éluée par un gradient d'imidazole (20 → 250 mM) en 10 volumes de colonne. Les fractions contenant la protéine N ont été rassemblées et analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes puis coloration au bleu de Coomassie. Les résultats illustrés par la figure 5 montrent que le protocole employé permet de purifier la protéine N avec une homogénéité très satisfaisante (95%) et un rendement moyen de 15 mg de protéine par litre de culture.

#### 5) Purification de la protéine S<sub>C</sub> à partir de pIV2.4S<sub>C</sub> (pIV2.4S<sub>I</sub>)

Le protocole suivi pour purifier la protéine S courte est très différent de celui décrit ci-dessus car la protéine est fortement agrégée dans le système bactérien (corps d'inclusion). Les bactéries BL21(DE3)pDIA17, transformées par le vecteur d'expression pIV2.4S<sub>I</sub>, ont été cultivées à 30°C dans 1 litre de milieu de culture contenant 0,1 mg/ml d'ampicilline, et induites par 1 mM IPTG quand la densité cellulaire, équivalente à  $A_{600} = 0,8$ , est atteinte (environ 3 heures). Après 2 heures de culture en présence d'inducteur, les cellules ont été récupérées par centrifugation (10 min à 5000 rpm), remises en suspension dans le tampon de lyse (0,1 M Tris-HCl, EDTA 1 mM, pH 7,5), et lysées par la presse de French (1200 psi). Après

centrifugation du lysat bactérien (15 min à 12000 rpm), le culot a été remis en suspension dans 25 ml de tampon de lyse contenant 2% Triton X100 et 10 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, puis centrifugé pendant 20 min à 12000 rpm. Le culot a été remis en suspension dans un tampon Tris-HCl 10 mM contenant 7 M urée, et mis en agitation douce pendant 30 min à température ambiante. Ce dernier lavage des corps d'inclusion avec 7 M urée est nécessaire pour éliminer la plupart des protéines membranaires d'*E. coli* qui co-sédimentent avec la protéine S<sub>C</sub> agrégée. Après une dernière centrifugation pendant 20 min à 12000 rpm, le culot final est remis en suspension dans le tampon Tris-HCl 10 mM. L'analyse électrophorétique de cette préparation (Figure 6) montre que la protéine S courte peut être purifiée avec une homogénéité satisfaisante (environ 90%) à partir des corps d'inclusion (extrait insoluble).

### **Exemple 3 : Immunodominance de la protéine N**

La réactivité des anticorps présents dans le sérum des patients atteints de pneumopathie atypique causée par le coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV), vis-à-vis des différentes protéines de ce virus, a été analysée par western-blot dans les conditions décrites ci-après.

#### **1) Matériel**

##### **a) lysats de cellules infectées par le SARS-CoV**

Des cellules Vero E6 ( $2 \times 10^6$ ) ont été infectées par le SARS-CoV (isolat répertorié sous le numéro FFM/MA104) à une multiplicité d'infection (M.O.I.) de  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$  puis incubées dans du milieu DMEM contenant 2% de SVF, à 35°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>. 48 heures plus tard, le tapis cellulaire a été lavé avec du PBS puis lysé avec 500  $\mu$ l de tampon de dépôt préparé selon Laemmli et contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les échantillons ont ensuite été bouillis 10 minutes puis soniqués 3 fois 20 secondes.

##### **b) anticorps**

##### **b<sub>1</sub>) sérum de patient atteint de pneumopathie atypique**

Le sérum référencé au Centre National de Référence des virus influenzae (Région-Nord) sous le N° 20033168 est celui d'un patient français atteint d'une pneumopathie atypique causée par le SARS-CoV prélevé au jour 38 après le

début des symptômes ; le diagnostic d'infection par le SARS-CoV a été réalisé par RT-PCR nichée et PCR quantitative.

b<sub>2</sub>) sérums polyclonaux de lapin monospécifiques dirigés contre la protéine N ou la protéine S

5 Les sérums sont ceux produits à partir des protéines recombinantes N et S<sub>C</sub> (exemple 2), selon le protocole d'immunisation décrit à l'exemple 4 ; il s'agit du sérum du lapin P13097 (sérum anti-N) et du sérum du lapin P11135 (sérum anti-S).

## 2) Méthode

20 µl de lysat de cellules infectées par le SARS-CoV à des M.O.I. de  
10 10<sup>-1</sup> et 10<sup>-2</sup> et, à titre de contrôle, 20 µl d'un lysat de cellules non infectées (mock) ont été séparés sur un gel SDS à 10% de polyacrylamide puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Après blocage dans une solution de PBS/lait 5%/Tween 0,1% et lavage en PBS/Tween 0,1%, cette membrane a été hybridée pendant une nuit à 4°C avec : (i) l'immun-sérum N° 20033168 dilué au 1/300, 1/1000 et 1/3000 dans le  
15 tampon PBS/BSA 1%/Tween 0,1%, (ii) le sérum du lapin P13097 (sérum anti-N) dilué au 1/50000 dans le même tampon et (iii) le sérum du lapin P11135 (sérum anti-S) dilué au 1/10000 dans le même tampon. Après lavage en PBS/Tween, une hybridation secondaire a été réalisée à l'aide, soit d'anticorps polyclonaux de mouton dirigés contre les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines G humaines et couplés à la  
20 peroxidase (NA933V, Amersham), soit d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines G de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). Les anticorps fixés ont été révélés à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et de films d'autoradiographie Hyperfilm MP (Amersham). Une échelle de masse moléculaire (kDa) est portée sur la figure.

## 25 3) Résultats

La figure 7 montre que trois polypeptides de masse moléculaire apparente 35, 55 et 200 kDa sont détectés spécifiquement dans les extraits de cellules infectées par le SARS-CoV.

Afin d'identifier ces polypeptides, deux autres immunoempreintes  
30 (figure 8) ont été réalisées sur les mêmes échantillons et dans les mêmes conditions avec des anticorps polyclonaux de lapins spécifique de la nucléoprotéine N (lapin P13097, figure 8A) et de la protéine de spicule S (lapin P11135, figure 8B) Cette



expérience montre que le polypeptide de 200 kDa correspond à la glycoprotéine de spicule S du SARS-CoV, que le polypeptide de 55 kDa correspond à la nucléoprotéine N tandis que le polypeptide de 35 kDa représente vraisemblablement une forme tronquée ou dégradée de la N.

5 Les données présentées dans la figure 7 montrent donc que le sérum 20033168 réagit fortement avec la N et beaucoup plus faiblement avec la S du SARS-CoV, puisque les polypeptides de 35 et 55 kDa sont révélés sous la forme de bandes intenses pour des dilutions de 1/300, 1/1000 et 1/3000 de l'immunsérum alors que le polypeptide de 200 kDa n'est que faiblement révélé pour une dilution de 1/300. On  
10 peut noter également qu'aucun autre polypeptide du SARS-CoV n'est détecté pour des dilutions supérieures au 1/300 du sérum 20033168.

Cette expérience indique que la réponse en anticorps spécifique de la N du SARS-CoV domine les réponses en anticorps spécifiques des autres polypeptides du SARS-CoV et en particulier la réponse en anticorps dirigée contre la  
15 glycoprotéine S. Elle indique une immunodominance de la nucléoprotéine N lors des infections humaines par le SARS-CoV.

#### **Exemple 4 : Préparation d'anticorps polyclonaux monospécifiques dirigés contre les protéines N et S du coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV)**

##### **1) Matériel et méthode**

20 Trois lapins (P13097, P13081, P13031) ont été immunisés avec le polypeptide recombinant purifié correspondant à l'intégralité de la nucléoprotéine (N), préparé selon le protocole décrit à l'exemple 2. Après une première injection de 0,35 mg par lapin de protéine émulsionnée en adjuvant complet de Freund (voie intra-dermique), les animaux ont reçus 3 injections de rappel à 3 puis 4 semaines  
25 d'intervalle, de 0,35 mg de protéine recombinante émulsionnée en adjuvant incomplet de Freund.

Trois lapins (P11135, P13042, P14001) ont été immunisés avec le polypeptide recombinant correspondant au fragment court de la protéine S (Sc), produit comme décrit à l'exemple 2. Comme ce polypeptide est retrouvé principale-  
30 ment sous la forme de corps d'inclusion dans le cytoplasme bactérien, les animaux ont reçus 4 injections intra-dermiques à 3-4 semaines d'intervalle d'une préparation de corps d'inclusion correspondant à 0,5 mg de protéine recombinante émulsionnée en

adjuvant incomplet de Freund. Les 3 premières injections ont été réalisées avec une préparation de corps d'inclusion préparés selon le protocole décrit à l'exemple 2, tandis que la quatrième injection a été réalisée avec une préparation de corps d'inclusion qui ont été préparés selon le protocole décrit à l'exemple 2 puis purifiés  
5 sur gradient de saccharose et lavés en 2 % Triton X100.

Pour chaque lapin, un sérum pré-immun (p.i.) a été préparé avant la première immunisation et un immun-sérum (I.S.) 5 semaines après la quatrième immunisation.

Dans un premier temps, la réactivité des sérums a été analysée par  
10 test ELISA vis à vis de préparations de protéines recombinantes semblables à celles utilisées pour les immunisations ; les tests ELISA ont été réalisés selon le protocole et avec les réactifs tels que décrits à l'exemple 6.

Dans un deuxième temps, la réactivité des sérums a été analysée en réalisant une immunoempreinte (western blot) d'un lysat de cellules infectées par le  
15 SARS-CoV, en suivant le protocole tel que décrit à l'exemple 3.

## 2) Résultats

Les tests ELISA (figure 9) démontrent que les préparations de protéine N recombinante et de corps d'inclusion du fragment court de la protéine S (S<sub>C</sub>) sont immunogènes chez l'animal et que le titre des sérums immuns est élevé (plus  
20 de 1/25000).

L'immunoempreinte (figure 8) montre que le sérum immun du lapin P13097 reconnaît deux polypeptides présents dans les lysats de cellules infectées par le SARS-CoV : un polypeptide dont la masse moléculaire apparente (50-55 kDa selon les expériences) est compatible avec celle de la nucléoprotéine N (422 résidus, masse  
25 moléculaire prédite de 46 kDa) et un polypeptide de 35 kDa, qui représente vraisemblablement une forme tronquée ou dégradée de la N.

Cette expérience montre également que le sérum du lapin P11135 reconnaît principalement un polypeptide dont la masse moléculaire apparente (180-220 kDa selon les expériences) est compatible avec une forme glycosylée de la S  
30 (1255 résidus, chaîne polypeptidique non glycosylée de 139 kDa), ainsi que des polypeptides plus légers, qui représentent vraisemblablement des formes tronquées et/ou non glycosylées de la S.

En conclusion, l'ensemble de ces expériences démontrent que des polypeptides recombinants exprimés chez *E. coli* et correspondant aux protéines N et S du SARS-CoV permettent d'induire chez l'animal des anticorps polyclonaux capables de reconnaître les formes natives de ces protéines.

5 **Exemple 5 : Préparation d'anticorps polyclonaux monospécifiques dirigés contre les protéines M et E du coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV)**

1) **Analyse de la structure des protéines M et E**

a) **Protéine E**

La structure de la protéine E du SARS-CoV (76 acides aminés) a été  
10 analysée *in silico*, à l'aide de différents logiciels comme signalP v1.1, NetNGlyc 1.0, THMM 1.0 et 2.0 (Krogh et al., 2001, J. Mol. Biol., 305(3):567-580) ou encore TOPPRED (von Heijne, 1992, J. Mol. Biol. 225, 487-494). L'analyse montre que ce polypeptide non glycosylé est une protéine membranaire de type 1, contenant une  
15 seule hélice transmembranaire (aa 12-34 d'après THMM), et dont la plus grande partie du domaine hydrophile (42 résidus) est localisée à l'extrémité C-terminale et vraisemblablement à l'intérieur de la particule virale (endodomaine). On peut noter une inversion dans la topologie prédite par les versions 1.0 (N-ter est externe) et 2.0 (N-ter est interne) du logiciel THMM, mais que d'autres algorithmes, notamment TOPPRED et THUMBUP (Zhou et Zhou, 2003, Protein Science 12 :1547-1555) confirment une  
20 localisation externe de l'extrémité N-terminale de E.

b) **Protéine M**

Une analyse similaire réalisée sur la protéine M du SARS-CoV (221 acides aminés) montre que ce polypeptide ne possède pas de peptide signal (d'après le logiciel signalP v1.1) mais trois domaines transmembranaires (résidus 15-37, 50-72,  
25 77-99 d'après THMM2.0) et un grand domaine hydrophile (aa 100-221) localisé à l'intérieur de la particule virale (endodomaine). Elle est vraisemblablement glycosylée sur l'asparagine en position 4 (d'après NetNGlyc 1.0).

Ainsi, en accord avec les données expérimentales connues pour les autres coronavirus, il est remarquable que les deux protéines M et E présentent des  
30 endodomaines correspondant à la majeure partie des polypeptides et des ectodomaines de très petite taille.

- l'ectodomaine de E correspond vraisemblablement aux résidus 1 à 11 ou 1 à 12 de la protéine : MYSFVSEETGT(L), SEQ ID NO : 70. En effet, la probabilité associée à la localisation transmembranaire du résidu 12 est intermédiaire (0,56 d'après THMM 2.0).

5 - l'ectodomaine de M correspond vraisemblablement aux résidus 2 à 14 de la protéine : ADNGTITVEELKQ, SEQ ID NO : 69. En effet, la méthionine N-terminale de M est très probablement clivée du polypeptide mature car le résidu en position 2 est une Alanine (Varshavsky, 1996, 93:12142-12149).

Par ailleurs, l'analyse de l'hydrophobicité (Kyte & Doolittle, Hopp  
10 & Woods) de la protéine E met en évidence que l'extrémité C-terminale de l'endodomaine de E est hydrophile et donc vraisemblablement exposée à la surface de ce domaine. Ainsi, un peptide synthétique correspondant à cette extrémité est un bon candidat immunogène pour induire chez l'animal des anticorps dirigés contre l'endodomaine de E. En conséquence, un peptide correspondant aux 24 résidus C-  
15 terminaux de E a été synthétisé.

## **2) Préparation d'anticorps dirigés contre l'ectodomaine des protéines M et E et l'endodomaine de la protéine E**

Les peptides M2-14 (ADNGTITVEELKQ, SEQ ID NO : 69), E1-  
12 (MYSFVSEETGTL, SEQ ID NO : 70) et E53-76 (KPTVYVYSRV  
20 KNLNSSEGVP DLLV, SEQ ID NO : 71) ont été synthétisés par Neosystem. Ils ont été couplés à la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) à l'aide du MBS (m-maleimido-benzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) via une cystéine ajoutée au cours de la synthèse soit en N-terminal du peptide (cas de E53-76) soit en C-terminal (cas de M2-14 et E1-  
12).

25 Deux lapins ont été immunisés avec chacun des conjugués, en suivant le protocole d'immunisation suivant : après une première injection de 0,5 mg de peptide couplé à la KLH et émulsionné en adjuvant complet de Freund (voie intradermique), les animaux reçoivent 2 à 4 injections de rappel à 3 ou 4 semaines d'intervalle de 0,25 mg de peptide couplé à la KLH et émulsionné en adjuvant  
30 incomplet de Freund.

Pour chaque lapin, un sérum pré-immun (p.i.) a été préparé avant la première immunisation et un immun-sérum (I.S.) est préparé 3 à 5 semaines après les injections de rappel.

La réactivité des sérums a été analysée par western blot à l'aide  
5 d'extraits de cellules infectées par le SRAS-CoV (figure 43B) ou à l'aide d'extraits de cellules infectées par un virus recombinant de la vaccine exprimant la protéine E (VV-TG-E, figure 43A) ou M (VV-TN-M, figure 43C) de l'isolat 031589 du SRAS-CoV.

Les immunosérums des lapins 22234 et 22240, immunisés par le conjugué KLH-E53-76, reconnaissent un polypeptide d'environ 9 à 10kD, qui est  
10 présent dans les extraits de cellules infectées par le SRAS-CoV mais absent dans les extraits de cellules non infectées (figure 43B). La masse apparente de ce polypeptide est compatible avec la masse prédite de la protéine E, qui est de 8,4 kD. De façon similaire, l'immunosérum du lapin 20047, immunisé par le conjugué KLH-E1-12, reconnaît un polypeptide présent dans les extraits de cellules infectées par le virus  
15 VV-TG-E, dont la masse molaire apparente est compatible avec celle de la protéine E (figure 43A).

L'immunosérum des lapin 20013 et 20080, immunisés par le conjugué KLH-M2-14, reconnaît un polypeptide présent dans les extraits de cellules infectées par le virus VV-TN-M (figure 43C), dont la masse molaire apparente (18 kD  
20 environ) est compatible avec celle de la glycoprotéine M, qui est de 25,1 kD et présente un point isoélectrique élevé (9.1 pour le polypeptide nu).

Ces résultats démontrent que les peptides E1-12 et E53-76 d'une part et le peptide M2-14 d'autre part permettent d'induire chez l'animal des anticorps polyclonaux capables de reconnaître les formes natives des protéines E et M  
25 respectivement du SRAS-CoV.

**Exemple 6 : Analyse de la réactivité en ELISA de la protéine N recombinante, vis-à-vis de sérums de patients atteints de SRAS**

**1) Matériel**

L'antigène utilisé pour préparer les phases solides est la nucléo-  
30 protéine N recombinante purifiée préparée selon le protocole décrit à l'exemple 2.

Les sérums à tester (Tableau IV) ont été choisis sur la base des résultats d'analyse de leur réactivité par immunofluorescence (titre IF-SRAS), vis-à-vis de cellules infectées par le SARS-CoV.

**Tableau IV: Sérums testés en ELISA**

Référence	N° sérum	Type de sérum	Date du Sérum***	Titre IF-SRAS
3050	A	Témoin	na*	nt**
3048	B	Témoin	na	nt
033168	D	Patient 1- SRAS	27/04/03 (J38)	320
033397	E	Patient-1 SRAS	11/05/03 (J52)	320
032632	F	Patient-2 SRAS	21/03/03 (J17)	2500
032791	G	Patient-3 SRAS	04/04/03 (J3)	<40
033258	H	Patient-3 SRAS	28/04/03 (J27)	160

\*na : non-applicable. \*\* nt : non-testé. \*\*\* les dates indiquées correspondent au nombre de jours après le début des symptômes de SRAS.

## 2) Méthode

La protéine N (100  $\mu$ l) diluée à différentes concentrations dans du tampon carbonate 0,1 M, pH 9,6 (1, 2 ou 4  $\mu$ g/ml) est distribuée dans les puits de plaques ELISA, puis les plaques sont incubées une nuit à température du laboratoire. Les plaques sont lavées avec du tampon PBS-Tween, saturées avec du tampon PBS-lait écrémé-saccharose (5 %). Les sérums à tester (100  $\mu$ l) préalablement dilués (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 et 1/3200) sont ajoutés, puis les plaques sont incubées 1 h à 37° C. Après 3 lavages, le conjugué anti-IgG humaines marqué à la peroxydase (référence 209-035-098, JACKSON) dilué au 1/18000 est ajouté puis les plaques sont incubées 1h à 37 °C. Après 4 lavages, le chromogène (TMB) et le substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sont ajoutés et les plaques sont incubées 30min à température ambiante, à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite arrêtée puis l'absorbance à 450 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur automatique.

## 3) Résultats

Les tests ELISA (figure 10) démontrent que la préparation de protéine N recombinante est reconnue spécifiquement par les anticorps de sérums de patients atteints de SRAS prélevés en phase tardive de l'infection ( $\geq$  17 jours après le début des symptômes) alors qu'elle n'est pas reconnue de façon significative par les anticorps d'un sérum de patient prélevé en phase précoce de l'infection (3 jours après le début des symptômes) ni par des sérums témoins de sujets non atteints de SRAS.

**Exemple 7 : Tests ELISA élaborés pour une détection très spécifique et sensible d'une infection par le coronavirus associé au SRAS, à partir de sérums de patients**

**1) Test ELISA IgG indirect**

5

**a) Réactifs**

*Préparation des plaques*

10 Les plaques sont sensibilisées par une solution de protéine N à 2µg/mL dans un tampon PBS 10mM pH 7,2, rouge de phénol à 0,25mL /L. 100 µL de solution sont déposés dans les puits et laissés incubés à température ambiante pendant une nuit. La saturation se fait par un prélavage en tampon PBS 10mM / tween 0,1%, suivi d'un lavage avec une solution de saturation PBS, 25% lait /saccharose.

15 *Diluant serums*

Tampon TRIS 0,48g/L, PBS 10mM, EDTA 3,7g/L, lait 15% v/v , pH 6,7

*Diluant conjugué*

20 Tampon citrate (15g/L), tween 0,5% , serum bovin 25%, NaCl 12%, lait écrémé 6% v/v PH 6,5

*Conjugué*

Conjugué anti-IgG humaines 50X, commercialisés par Bio-Rad : kit Platelia H. pylori ref 72778

*Autres solutions :*

25 Solution de lavage R2, Solutions de révélation au TMB R8 diluant, R9 chromogène, R10 solution d'arrêt : réactifs commercialisés commercialisées par Bio-Rad (ex : kit *Platelia pylori*, ref 72778)

**b) Mode opératoire**

30 Diluer les sérums au 1/200 dans le diluant échantillons  
Distribuer 100µL/puits  
Incubation 1h à 37°C  
3 lavages en solution de LAVAGE R2 10x préalablement diluée 10 fois en eau déminéralisée (*i.e.*, solution de lavage 1X)

Distribuer 100µL de conjugué (conjugué 50x à diluer extemporanément dans le diluant conjugué fourni)

Incubation 1h à 37°C

4 lavages en solution de lavage 1X

- 5 distribuer 200µL/puits de solution de révélation (à diluer extemporanément ex: 1 mL de R9 dans 10mL de R8)

Incubation 30 min à température ambiante à l'obscurité

arrêter la réaction avec 100µL/puits de R10

LECTURE à 450/620nm

- 10 Les résultats peuvent être interprétés en prenant un serum SEUIL donnant une réponse au delà de laquelle les serums testés seront considérés comme positifs. Ce sérum est choisi et dilué de façon à donner un signal significativement supérieur au bruit de fond.

## 2) Test ELISA DOUBLE EPITOPE

- 15 a) Réactifs

### *Préparation des plaques*

- 20 Les plaques sont sensibilisées par une solution de protéine N à 1µg/mL dans un tampon PBS 10mM pH 7,2, rouge de phénol à 0,25mL /L. 100 µL de solution sont déposés dans les puits et laissés incubés à température ambiante pendant une nuit. La saturation se fait par un prélavage en tampon PBS 10mM / 0,1% tween suivi d'un lavage avec une solution de saturation PBS 10mM, lait 25% (V/V)

- 25 *Diluant serums et conjugué*

Tampon TRIS saline 50mM pH8, lait 2%

### *Conjugué*

- Il s'agit de la protéine N recombinante purifiée, couplée à la peroxidase selon le protocole de Nakane (Nakane P.K. and Kawaoi A; (1974) :  
30 *Peroxydase-labeled antibody, a new method of conjugation. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* Vol22, N)23, pp 1084-1091.), dans des ratios molaires respectifs 1/2. Ce conjugué ProtN POD est utilisé à une concentration de 2µg/mL dans du diluant serum/conjugué.



*Autres solutions :*

Solution de lavage R2, Solutions de révélation au TMB R8, diluant , R9 chromogène, R10 solution d'arrêt : réactifs commercialisées par Bio-Rad (ex kit platelia pylori ref 72778).

5

b) Mode opératoire*1ere étape en plaque de "prédilution"*

- Diluer chaque sérum au 1/5 dans la plaque de prédilution (48 µL de diluant +12  
10 µL de sérum).
- Après avoir dilués l'ensemble des serums, distribuer 60µL de conjugué
- Le cas échéant, le mélange sérum + conjugué est laissé à incuber.

*2eme étape en plaque de "réaction"*

- 15 ▪ Transférer 100µLde mélange/puits dans la plaque de réaction
- Incubation 1h 37°C
- 5 lavages en solution de LAVAGE R2 10x préalablement diluée 10 fois en eau déminéralisée (--> solution de lavage 1x)
- distribuer 200µL/puits de solution de révélation (à diluer extemporanément ex:1  
20 mL de R9 dans 10mL de R8)
- incubation 30min à température ambiante à l'abri de la lumière
- arrêter la réaction avec 100µL/puits de R10
- LECTURE à 450/620nm

De même que pour le test ELISA indirect, les résultats peuvent être  
25 interprétés en utilisant un serum "valeur seuil". Tout serum ayant une réponse supérieure au sérum valeur seuil sera considéré comme positif.

**2) Résultats**

Les sérums de patients classés comme cas probables de SRAS de l'hôpital français de Hanoi, Vietnam ou en relation avec l'hôpital français de Hanoi  
30 (JYK) ont été analysés en utilisant le test IgG-N indirect et le test N double épitope.

Les résultats du test IgG-N indirect (figures 14 et 15) et N double épitope (figures 16 et 17) montrent une excellente corrélation entre eux ainsi qu'avec un test ELISA indirect comparant la réactivité des sérums vis-à-vis d'un lysat de

cellules VeroE6 non infectées ou infectées par le SRAS-CoV (ELISA-lysate SRAS-CoV ; voir le Tableau V ci-après). Tous les sérums prélevés 12 jours ou plus après le début des symptômes ont été trouvés positifs, y compris chez des patients pour lesquels l'infection par le virus du SRAS-CoV n'avait pas pu être documentée par analyse de prélèvements respiratoires par RT-PCR, vraisemblablement en raison d'un 5 prélèvement trop tardif au cours de l'infection ( $\geq$  J12). Dans le cas du patient TTH pour lequel un prélèvement nasal réalisé à J7 a été trouvé négatif par RT-PCR, la qualité du prélèvement pourrait être en cause.

Certains sérums ont été trouvés négatifs alors que la présence de 10 SRAS-CoV a été détectée par RT-PCR. Il s'agit dans tous les cas de sérums précoces prélevés moins de 10 jours après le début des symptômes (ex : sérum # 032637). Dans le cas d'un patient PTTH (sérum # 032673), seule une suspicion de SRAS était évoquée au moment où les prélèvements ont été réalisés.

En conclusion, les tests sérologiques IgG-N indirect et N-double 15 épitope permettent de documenter l'infection par le SRAS-CoV chez tous les patients pour des sérums prélevés 12 jours ou plus après l'infection.

**Tableau V : Résultats des tests ELISA**

Num Pvt	Patient	Jour	PCR-SARS (1)	ELISA lysat SRAS-CoV (2)	IgG-N (2 <sup>ème</sup> série)	2Xépitope (2 <sup>ème</sup> série)
033168	JYK	38	POS	+++	>5000	NT
033597	JYK	74	POS	NT	$\approx$ 5000	NT
032552	VTT	8	NEG-J3&J8&J12	NEG	<200	<5
032544	CTP	16	NEG J16&J20	++	>5000	>>20
032546	CJF	15	NEG J15&J19	++	>5000	>>20
032548	PTL	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032550	NTH	17	NEG-J17&J21	++	>5000	>>20
032553	VTT	8	NEG-J3&J8&J12	NEG	<200	<5
032554	NTBV	4	POS	NEG	<200	<5
032555	NTBV	4	POS	NEG	<200	
032564	NTP	15	POS	++	>5000	>>20
032629	NVH	4	POS	NEG	<200	<5
032631	BTTX	9	POS	NEG	<200	<5
032635	NHH	4	POS	NEG	<200	<5
032637	NHB	10	POS	NEG	<200	<5
032642	BTTX	9	POS	NEG	<200	<5

032643	LTDH	1	POS	NEG	<200	<5
032644	NTBV	4	POS	NEG	<200	<5
032646	TTH	12	NEG J7&J12&J16	++	>5000	>>20
032647	DTH	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032648	NNT	15	NEG J15&J19	++	>5000	>>20
032649	PTH	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032672	LVV	16	NEG J16&J20	+	>5000	>>20
032673	PTTH	NA	NEG	NEG	<200	<5
032674	PNB	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032682	VTH	12	NEG J12&J16	++	>5000	>>20
032683	DTV	17	NEG J17&J21	+	>1000	>>20

Notes:

(1) : Les analyses par RT-PCR ont été réalisées par RT-PCR nichée BNI, LC Artus et LC-N sur des écouvillonnages nasaux ou pharyngés; POS signifie qu'au moins un prélèvement a été trouvé positif chez ce patient.

- 5 (2) : La réactivité des sérums dans le test ELISA utilisant un lysat de cellules infectées par le SRAS-CoV a été classée en très fortement réactif (+++), fortement réactif (++), réactif (+) et négatif en fonction de la valeur DO obtenue aux dilutions testées

**Exemple 8 : Détection du coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV) par RT-PCR**

- 10 1) Mise au point de conditions de RT-PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques du gène de la protéine de nucléocapside – test "Light Cycler N"

a) conception des amorces et des sondes

La conception des amorces et sondes a été réalisée à partir de la séquence du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589, à l'aide du programme "Light Cycler Probe Design (Roche)". Ainsi les deux séries d'amorces et de sondes suivantes ont été sélectionnées :

- série 1 (SEQ ID NO : 60, 61, 64, 65):

- amorce sens : N/+ /28507 : 5'-GGC ATC GTA TGG GTT G-3' [28507-28522]

- amorce antisens : N/- /28774 : 5'-CAG TTT CAC CAC CTC C-3' [28774-28759]

- 20 - sonde 1 : 5'-GGC ACC CGC AAT CCT AAT AAC AAT GC-fluorescéine 3' [28561-28586]

- sonde 2 : 5' Red705 -GCC ACC GTG CTA CAA CTT CCT-phosphate [28588-28608]

- série 2 (SEQ ID NO : 62, 63, 66, 67)

- amorce sens : N/+ /28375 : 5'-GGC TAC TAC CGA AGA G-3' [28375-28390]

- amorce antisens : N/- /28702 : 5'-AAT TAC CGC GAC TAC G-3' [28702-28687]

5 - sonde 1 : SRAS/N/FL : 5'-ATA CAC CCA AAG ACC ACA TTG GC - fluorescéine 3' [28541-28563]

- sonde 2 : SRAS/N/LC705 : 5' Red705 -CCC GCA ATC CTA ATA ACA ATG CTG C-phosphate 3' [28565-28589]

10 b) analyse de l'efficacité des deux couples amorces

Afin de tester l'efficacité respective des deux couples d'amorces, une amplification par RT-PCR a été réalisée sur un ARN synthétique correspondant aux nucléotides 28054-29430 du génome de la souche de SARS-CoV issue du prélèvement répertorié sous le numéro 031589 et contenant la séquence du gène N.

15 De manière plus précise :

Cet ARN synthétique a été préparé par transcription *in vitro* à l'aide de l'ARN polymérase du phage T7, d'une matrice d'ADN obtenu par linéarisation du plasmide SRAS-N avec l'enzyme *Bam HI*. Après élimination de la matrice d'ADN par digestion à l'aide de DNase 1, les ARN synthétiques sont purifiés par une extraction  
20 au phénol-chloroforme suivie de deux précipitations successives en acétate d'ammonium et isopropanol. Ils sont alors quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 nm et leur qualité est contrôlée par le rapport des absorbances à 260 et 280 nm ainsi que par une électrophorèse en gel d'agarose. Ainsi, la concentration de la préparation d'ARN synthétique utilisée pour ces études est de 1,6 mg/ml, ce qui correspond à  
25  $2,1.10^{15}$  copies/ml d'ARN.

Des quantités décroissantes d'ARN synthétique ont été amplifiées par RT-PCR à l'aide du kit "Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq" et les couples d'amorces n° 1 (N/+ /28507, N/- /28774) (figure 1A) et n° 2 (N/+ /28375, N/- /28702) (figure 1B), en suivant les indications du fournisseur. Les conditions d'ampli-  
30 fication utilisées sont les suivantes : l'ADNc a été synthétisé par incubation 30 min à 45 °C, 15 min à 55°C puis 2 min à 94 °C puis il a été amplifié par 5 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 45°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec, suivis de 35

cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec, avec 2 sec d'élongation supplémentaire à chaque cycle, et d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min. Les produits d'amplification obtenus ont ensuite  
 5 été maintenus à 10°C.

Les résultats présentés à la figure 11 montrent que le couple d'amorces n° 2 (N/+28375, N/-28702) permet de détecter jusqu'à 10 copies d'ARN (bande de faible intensité) ou 10<sup>2</sup> copies (bande de bonne intensité) contre 10<sup>4</sup> copies pour le couple d'amorces n° 1 (N/+28507, N/-28774). Les amplicons sont respecti-  
 10 vement de 268 pb (couple 1) et de 328 pb (couple 2).

c) mise au point de la RT-PCR en temps réel

Une RT-PCR en temps réel a été mise au point à l'aide du couple d'amorces n°2 et du couple de sonde constitué par SRAS/N/FL et SRAS/N/LC705 (figure 2).

15 L'amplification a été réalisée sur un LightCycler™ (Roche) à l'aide du kit "Light Cycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes " (référence 2 015 145, Roche) dans les conditions optimisées suivantes. Un Mélange réactionnel contenant : H<sub>2</sub>O (6,8 µl), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (0,8 µl, 4 µM final de Mg<sup>2+</sup>), mélange réactionnel 5X (4 µl), sonde SRAS/N/FL 3µM (0,5 µl, 0,075 µM final), sonde SRAS/N/LC705 3  
 20 µM (0,5 µl, 0,075 µM final), amorce N/+28375 10 µM (1 µl, 0,5 µM final), amorce N/-28702 10 µM (1 µl, 0,5 µM final), mélange d'enzyme (0,4 µl) et échantillon (ARN viral, 5 µl) a été amplifié en suivant le programme suivant :

- <u>Transcription inverse</u> :	50°C	10:00min	analysis mode: none
- <u>Dénaturation</u> :	95°C	30sec x1	analysis mode: none
25 - <u>Amplification</u> :	95°C	2sec	}
	50°C	15sec	analysis mode: <u>quantification*</u> } x45
	72°C	13sec	rampe thermique 2,0°C/sec }
- <u>refroidissement</u> :	40°C	30sec x1	analysis mode: none

\*La mesure de fluorescence se fait à la fin de l'hybridation et à chaque cycle (en mode  
 30 SINGLE).

Les résultats présentés à la figure 12 montrent que cette RT-PCR en temps réel est très sensible puisqu'elle permet de détecter  $10^2$  copies d'ARN synthétique dans 100% des 5 échantillons analysés (29/29 échantillons dans 8 expériences) et jusqu'à 10 copies d'ARN dans 100% des 5 échantillons analysés (40/45 échantillons dans 8 expériences). Elle montre également que cette RT-PCR permet de détecter la présence du génome du SARS-CoV dans un échantillon et de quantifier le nombre de génomes présents. A titre d'exemple, l'ARN viral d'un stock de SARS-CoV cultivé sur cellules Vero E6 a été extrait à l'aide du kit "Qiaamp viral RNA extraction" (Qiagen), dilué à  $0,05.10^{-4}$  et analysé par RT-PCR en temps réel selon le protocole décrit ci-dessus; l'analyse présentée à la figure 12 montre que ce stock de virus contient  $6,5.10^9$  génomes —équivalents/ml (geq/ml), ce qui est tout à fait similaire à la valeur de  $1,0.10^{10}$  geq/ml mesurée à l'aide du kit "RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents" commercialisé par Artus.

**2) Mise au point de conditions de RT-PCR nichée ciblant le gène de l'ARN polymérase – test "RT-PCR nichée CDC (Centers for Disease Control and Prevention) /IP"**

a) Extraction de l'ARN viral

Echantillon clinique : QIAamp viral RNA Mini Kit (QIAGEN) selon les indications du fabricant, ou une technique équivalente. L'ARN est élué dans un volume de 60 µl.

b) RT-PCR nichée "SNE/SAR"

*Première étape : RT-PCR couplée « SNE »*

Le kit Invitrogen "Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq" a été utilisé, mais le kit "Titan" de Roche Boehringer peut lui être substitué avec des résultats similaires.

Oligonucléotides :

- SNE-S1 5' GGT TGG GAT TAT CCA AAA TGT GA 3'
- SNE-AS1 5' GCA TCA TCA GAA AGA ATC ATC ATG 3'

-> Taille attendue : **440 pb**

1. Préparer un mix :

H2O 6,5 µl

- |   |                     |         |
|---|---------------------|---------|
|   | Reaction mix 2X     | 12,5 µl |
|   | Oligo SNE-S1 50 µM  | 0,2 µl  |
|   | Oligo SNE-AS1 50 µM | 0,2 µl  |
|   | RNasin 40 U/µl      | 0,12 µl |
| 5 | RT/Platinum Taq mix | 0,5 µl  |
2. A 20 µl du mix, ajouter 5 µl d'ARN et procéder à l'amplification sur thermocycleur (conditions ABI 9600) :
- 2.1 45°C 30 min.  
55°C 15 min.
- 10 94°C 2 min.
- 2.2. 94°C 15 sec. }
- 45°C 30 sec. } x 5 cycles
- 72°C 30 sec. }
- 2.3. 94°C 15 sec. }
- 15 55°C 30 sec. } x 35 cycles
- 72°C 30 sec. + 2sec./cycle }
- 2.4. 72°C 5 min.
- 2.5 10°C ∞
- Conservation à +4°C.
- 20 La RNasin (N2511/N2515) de Promega a été utilisée comme inhibiteurs de RNase.
- Des ARN synthétiques ont servi de témoin positif. A titre de contrôle, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> et 10 copies d'ARN synthétique R<sub>SNE</sub> ont été amplifiées dans chaque expérience.
- 25 *Seconde étape : PCR nichée "SAR"*
- Oligonucléotides :
- SAR1-S 5' CCT CTC TTG TTC TTG CTC GCA 3'
- SAR1-AS 5' TAT AGT GAG CCG CCA CAC ATG 3'
- > Taille attendue : **121 pb**
- 30 1. Préparer un mix :
- |  |                |         |
|--|----------------|---------|
|  | H2O            | 35,8 µl |
|  | Tampon Taq 10X | 5 µl    |

	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µl
	Mix dNTPs 5 mM	2 µl
	Oligo SAR1-S 50 µM	0,5 µl
	Oligo SAR1-AS 50 µM	0,5 µl
5	Taq ADN pol 5 U/µl	0,25 µl

L'*AmpliTaq DNA Pol* d'Applied Biosystems a été utilisée (tampon 10X sans MgCl<sub>2</sub>, réf 27216601).

2. A 48 µl du mix, ajouter 2 µl du produit de la première PCR et procéder à l'amplification (conditions ABI 9600) :

- |    |      |      |                       |               |
|----|------|------|-----------------------|---------------|
| 10 | 2.1. | 94°C | 2 min.                |               |
|    | 2.2. | 94°C | 30 sec.               | }             |
|    |      | 45°C | 45 sec.               | } x 5 cycles  |
|    |      | 72°C | 30 sec.               | }             |
|    | 2.3. | 94°C | 30 sec.               | }             |
| 15 |      | 55°C | 30 sec.               | } x 35 cycles |
|    |      | 72°C | 30 sec. + 1sec./cycle | }             |
|    | 2.4. | 72°C | 5 min.                |               |
|    | 2.5  | 10°C | ∞                     |               |

3. Analyser 10 µl du produit réactionnel sur gel "*low-melting*" (type Seakem GTG) à 3% d'agarose.

La sensibilité du test niché est en routine, dans les conditions décrites, de 10 copies d'ARN.

4. Les fragments peuvent ensuite être purifiés sur QIAquick PCR kit (QIAGEN) et séquencés avec les oligos SAR1-S et SAR1-AS.

### 25 3) Détection de l'ARN du SARS-CoV par PCR à partir de prélèvements respiratoires

#### a) Première étude comparative

Une étude comparative a été réalisée sur une série de prélèvements respiratoires reçus par le Centre National de Référence du Virus Influenzae (région nord) et susceptibles de contenir du SARS-CoV. Pour ce faire, l'ARN a été extrait des 30 prélèvements à l'aide du kit "Qiampr viral RNA extraction" (Qiagen) et analysé par



RT-PCR en temps réel, d'une part à l'aide des couples d'amorces et de sondes de la série n° 2 dans les conditions décrites ci-dessus d'une part, et d'autre part à l'aide du kit "LightCycler SARS-CoV quantification kit" commercialisé par Roche (référence 03 604 438). Les résultats sont résumés dans le Tableau VI ci-dessous. Ils montrent

5 que 18 des 26 prélèvements sont négatifs et 5 des 26 prélèvements sont positifs pour les deux kits, tandis qu'un prélèvement est positif pour le seul kit Roche et deux pour les seuls réactifs N "série2". En outre, pour 3 prélèvements (20032701, 20032712, 20032714) les quantités d'ARN détectés sont nettement supérieures avec les réactifs (sondes et amorces) de la série n°2. Ces résultats indiquent que les amorces et sondes

10 N "série2" sont plus sensibles pour la détection du génome du SARS-CoV dans des prélèvements biologiques que celles du kit actuellement disponible.

**Tableau VI: Analyse par RT-PCR en temps réel des ARN extraits d'une série de prélèvements de 5 patients à l'aide des couples d'amorces et de sondes de la série n° 2 (N "série 2") ou du kit "LightCycler SARS-CoV quantification kit" (Roche).**

15 **Le type de prélèvement est indiqué ainsi que le nombre de copies de génome viral mesurées dans chacun des deux tests. NEG : RT-PCR négative.**

Prélèvements n°	Patient	Type de prélèvement	KIT ROCHE	N "série2"
20033082	K	nasal	NEG	NEG
20033083	K	pharyngé	NEG	NEG
20033086	K	nasal	NEG	NEG
20033087	K	pharyngé	NEG	NEG
20032802	M	nasal	NEG	NEG
20032803	M	expectoration	NEG	NEG
20032806	M	nasal ou pharyngé	NEG	NEG
20031746ARN2	C	pharyngé	NEG	NEG
20032711	C	nasal ou pharyngé	<b>39</b>	NEG
20032910	B	nasal	NEG	NEG
20032911	B	pharyngé	NEG	NEG
20033356	V	expectoration	NEG	NEG
20033357	V	expectoration	NEG	NEG
20031725	K	asp. endotrachéale	NEG	<b>150</b>
20032657	K	asp. endotrachéale	NEG	NEG
20032698	K	asp. endotrachéale	NEG	NEG
20032720	K	asp. endotrachéale	<b>3</b>	<b>5</b>
20033074	K	selles	<b>115</b>	<b>257</b>
20032701	M	pharyngé	<b>443</b>	<b>1676</b>
20032702	M	expectoration	NEG	<b>249</b>
20031747ARN2	C	pharyngé	NEG	NEG
20032712	C	inconnu	<b>634</b>	<b>6914</b>
20032714	C	pharyngé	<b>17</b>	<b>223</b>
20032800	B	nasal	NEG	NEG
20033353	V	nasal	NEG	NEG
20033384	V	nasal	NEG	NEG

b) Deuxième étude comparative

Les performances de différentes méthodes de RT-PCR nichée et de RT-PCR en temps réel ont ensuite été comparées pour 121 prélèvements respiratoires de cas possibles de SRAS de l'hôpital français de Hanoi, Vietnam, réalisés entre le 4<sup>ème</sup> et le 17<sup>ème</sup> jour après le début des symptômes. Parmi ces prélèvements, 14 avaient été trouvés positifs lors d'un premier test utilisant la méthode de RT-PCR nichée ciblant l'ORF1b (codant pour la réplicase) telle que décrite initialement par le Bernhard Nocht Institute (RT-PCR nichée BNI). Des informations concernant ce test sont disponibles sur internet, à l'adresse [http://www15.bni-hamburg.de/bni/bni2/neu2/getfile.acgi?area\\_engl=diagnostics&pid=4112](http://www15.bni-hamburg.de/bni/bni2/neu2/getfile.acgi?area_engl=diagnostics&pid=4112).

Les différents tests comparés dans cette étude sont :

- la méthode de RT-PCR quantitative selon l'invention, avec les amorces et sonde N "série 2" décrite ci-dessus (colonne Light Cycler N),
- le test de RT-PCR nichée ciblant le gène de l'ARN polymérase décrit ci-dessus, développé par le CDC, le BNI et l'Institut Pasteur (RT-PCR nichée CDC/IP),
- le kit ARTUS de référence "HPA Corona LC RT-PCR Kit # 5601-02", qui est un test de RT-PCR en temps réel ciblant le gène ORF1b,
- le test de RT-PCR nichée du BNI, ciblant également le gène de l'ARN polymérase, mentionné ci-dessus.

Les inventeurs ont constaté :

- 1) une variabilité inter-test pour une même technique, liée à la dégradation de la préparation d'ARN lors de décongélations répétées, notamment pour les échantillons contenant les quantités d'ARN les plus faibles,
- 2) une sensibilité réduite de la RT-PCR nichée CDC/IP par rapport à la RT-PCR nichée BNI, et
- 3) une sensibilité comparable du test de RT-PCR quantitative selon l'invention (Light Cycler N) par rapport au test Light Cycler (LC) Artus.

Ces résultats, présentés dans le Tableau VII ci-dessous, montrent que le test par RT-PCR quantitative selon l'invention constitue un excellent complément –

ou une alternative – aux tests actuellement disponibles. En effet, le coronavirus lié au SRAS est un virus émergent, susceptible d'évoluer rapidement. En particulier, le gène de la RNA polymérase du coronavirus lié au SRAS, qui est ciblé dans la plupart des tests actuellement disponibles, peut recombiner avec celui d'autres coronavirus non  
5 liés au SRAS. L'utilisation d'un test ciblant exclusivement ce gène pourrait alors conduire à l'obtention de faux négatifs.

Le test par RT-PCR quantitative selon l'invention ne cible pas la même région génomique que le kit ARTUS, puisqu'il cible le gène codant pour la protéine N. En réalisant un test de diagnostic ciblant deux gènes différents du  
10 coronavirus lié au SRAS, on peut donc espérer s'affranchir de résultats de type faux négatifs, qui pourraient être dus à l'évolution génétique du virus.

De plus, il apparaît particulièrement avantageux de cibler le gène de la protéine de nucléocapside, car il est très stable, du fait de la forte pression de sélection liée aux contraintes structurales élevées concernant cette protéine.

**Tableau VII:** Comparaison de différentes méthodes d'analyse par amplification génique, à partir de 121 Prélèvements de cas probables de SRAS de l'hôpital français de Hanoi, Vietnam (épidémie 2003)

N° CNR	Type prélèvement (1)	Jour prélèvement	Patient	RT-PCR nichée CDC/IP	RT-PCR nichée BNI	kit Light Cycler Artus	Light Cycler N (IP)
107 prélèvements	N et P			Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
032529	P	10	NHB	Négatif	Positif	Négatif	Négatif
032530	N	10	NHB	Positif	Positif	3,10E+01	4,20E+01
032531	P	7	LP	Positif	Positif	7,70E+00	3,10E+00
032534	N	15	BND	Positif	Positif	1,60E+00	Négatif
032600	P	4	NHH	Négatif	Positif	Négatif	1,30E+02
032612	P	17	NTS	Négatif	Positif	Négatif	Négatif
032688	P	9	BTX	Positif	Positif	Négatif	Négatif
032689	N	4	NVH	Positif	Positif	1,20E+01	2,30E+02
032690	P	4	NVH	Négatif	Positif	1,60E+00	Négatif
032727	P	8	NVH	Positif	Positif	2,30E+02	4,00E+02
032728	N	8	NVH	Positif	Positif	1,10E+03	1,60E+04
032729	P	14	NHB	Positif	Positif	5,90E+00	3,40E+01
032730	N	14	NHB	Positif	Positif	1,30E+02	4,80E+02
032741	P	8	NHH	Positif	Positif	2,10E+02	1,30E+02

positifs	10	14	10	9
fraction détectée des 14 positifs	71,4%	100,0%	71,4%	64,3%

- 5 (1) P= écouvillonnage pharyngé  
N= écouvillonnage nasal

**Exemple 9 : Obtention et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine N**

10 Des souris Balb C ont été immunisées à l'aide de la protéine N recombinante purifiée et leurs cellules spléniques fusionnées avec un myélome murin approprié selon les techniques de Köhler et Milstein.

Dix-neuf hybridomes sécréteurs d'anticorps anti N ont été présélectionnés et leurs immuno réactivités précisées. Ces anticorps reconnaissent  
15 bien la protéine N recombinante (en ELISA) avec des intensités variables, ainsi que la protéine virale, naturelle N en ELISA et/ou en Western Blot. Les figures 18 à 20 montrent les résultats de ces tests pour 15 de ces 19 anticorps monoclonaux.

Les clones 12, 17, 28, 57, 72, 76, 86, 87, 98, 103, 146, 156, 166, 170, 199, 212, 218, 219 et 222, fortement réactifs, ont été sous clonés. Les études de  
20 spécificité ont été poursuivies avec les outils appropriés afin de préciser les épitopes

reconnus et vérifier l'absence de réactivité vis-à-vis des autres Coronavirus humains et de certains virus respiratoires.

Les études de cartographie (*mapping*) épitopique (réalisées sur membrane spot, à l'aide de peptides chevauchants de 15 aa) et les études  
5 supplémentaires réalisées sur la protéine N naturelle en Western Blot ont révélé l'existence de 4 groupes d'anticorps monoclonaux :

1° Anticorps monoclonaux spécifiques d'un épitope linéaire majeur en position N-ter (75-81, séquence : INTNSVP)

Le représentant de ce groupe est l'anticorps 156. L'hybridome  
10 produisant cet anticorps a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) de l'Institut Pasteur (Paris, France) le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous le numéro I-3331. Ce même épitope est également reconnu par un sérum de lapin (polyclonal anti N) obtenu par immunisation classique à l'aide de cette même protéine N.

15 2° Anticorps monoclonaux spécifiques d'un épitope linéaire majeur situé en position centrale (position 217-224, séquence : ETALALL); les représentants de ce groupe sont les anticorps monoclonaux 87 et 166. L'hybridome produisant l'anticorps 87 a été déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous le numéro I-3328.

20 3° Anticorps monoclonaux spécifiques d'un épitope linéaire majeur situé en position C-terminale (position 403-408, séquence : DFFRQL), les représentants de ce groupe sont les anticorps 28, 57 et 143. L'hybridome produisant l'anticorps 57 a été déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous le numéro I-3330.

25 4° Anticorps monoclonaux spécifiques d'un épitope discontinu, conformationel. Ce groupe d'anticorps ne reconnaît aucun des peptides recouvrant la séquence de la protéine N, mais réagissent fortement sur la protéine naturelle non dénaturée. Le représentant de ce dernier groupe est l'anticorps 86. L'hybridome produisant cet anticorps a été déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous le numéro I-3329.

30 Le Tableau VIII ci-après résume les résultats de cartographie épitopique obtenus :

**Tableau VIII : Mapping épitopique des anticorps monoclonaux**

Anticorps	Epitope	Position	Région
28	DFSRQL Q	403 ... 408	C – Ter.

143	DFSRQL Q		
76	DFSRQL Q		
57	DFSRQL Q		
	FFGMS RI	315 ... 319	
146	LPQRQ	383 ... 387	
166	ETALALLLL	217 ... 224	centrale
87	ETALALL	217... 224	
156	INTNSGP	75... 81	N – Ter.
86	Conformationnel		
212	Conformationnel		
170	Conformationnel		

En outre, comme illustré notamment aux figures 18 et 19, ces anticorps ne présentent pas de réactivité en ELISA et/ou en WB, vis à vis de la protéine N du coronavirus humain 229 E.

5 **Exemple 10 : Combinaisons des anticorps monoclonaux pour le développement d'un test d'immunocapture sensible et spécifique de l'antigène viral N dans le sérum ou les fluides biologiques des patients contaminés par le virus SARS Co V**

Les anticorps listés ci-dessous ont été retenus en raison de leurs propriétés bien particulières pour une étude supplémentaire de capture et détection de la protéine virale N, dans le sérum des sujets ou patients.

Ces anticorps ont été produits en ascite sur souris, purifiés par chromatographie d'affinité et utilisés seuls ou en combinaison comme anticorps de capture, et comme anticorps signal.

Liste des anticorps sélectionnés pour le propos :

- 15 - Acm anti région C-ter (n° 28, 57, 143)  
 - Acm anti région centrale (n° 87, 166)  
 - Acm anti région N-ter (n° 156)  
 - Acm anti épitope discontinu, conformationnel (86)

1) Préparation des réactifs :

20 a) Plaques ELISA immunocapture

Les plaques sont sensibilisées avec les solutions d'anticorps à 5 µg/ml en tampon carbonate 0,1 M, pH.9,6. Les solutions (monovalentes ou plurivalentes) sont déposées sous volume de 100 µl dans les puits et incubées pendant une nuit à température ambiante. Ces plaques sont ensuite lavées en tampon PBS (10 mM pH 7,4 additionné de 0,1% de Tween 20) puis saturées avec une solution de PBS additionnée de 0,3% de BSA et de 5% de Saccharose). Les plaques sont ensuite séchées puis conditionnées dans un sachet en présence d'un dessicant. Elles sont prêtes à l'emploi.

#### b) Conjugués

Les anticorps purifiés ont été couplés à la peroxydase selon le protocole de Nakane (Nakane et al. - 1974, J.of Histo and cytochemistry, vol.22, p1084-1091) dans un rapport de une molécule d'IgG pour 3 molécules de peroxydase. Ces conjugués ont été purifiés par chromatographie d'exclusion et conservés concentrés (concentration comprise entre 1 à 2 mg/ml) en présence de 50% de glycerol et à -20°C. Ils sont dilués pour leur mise en œuvre dans les essais à la concentration finale de 1 ou 2 µg/ml en tampon PBS (pH 7,4) additionné de 1% de BSA.

#### c) Autres réactifs

- Sérums humains négatifs pour tous les marqueurs sériques des virus HIV, HBV, HCV et THLV
  - Pool de sérums humains négatifs additionné de 0,5% de Triton X 100
  - Ag viral inactivé : surnageant de culture virale inactivé par irradiation et inactivation vérifiée après mise en culture sur cellules sensibles - titre de la suspension avant inactivation environ  $10^7$  particules infectieuses par ml ou encore environ  $5 \times 10^9$  particules virales physiques par ml d'antigène
  - Les échantillons d'Ag dilués en sérum humain négatif : ces échantillons ont été préparés par dilution au 1:100<sup>e</sup> puis par dilution en série de raison 5.
- Ces échantillons non infectieux miment des échantillons humains supposés contenir des concentrations faibles à très faibles de nucléoprotéine virale N. De tels échantillons ne sont pas accessibles pour les travaux de routine

- Solution de lavage R2, solution de révélation TMB R8, chromogène R9 et solution d'arrêt R10, sont les réactifs génériques commercialisés par Bio-Rad dans ses trousse ELISA (ex : trousse *Platelia Pylori* ref.72778).

## 5 2) Mode opératoire

Les échantillons de sérums humains surchargés en Ag viral inactivé sont distribués à raison de 100 µl par cupule, directement dans les plaques sensibilisées, prêtes à l'emploi puis incubés pendant 1 heure à 37°C (incubation Bio-Rad IPS).

Le matériel non retenu par la phase solide est éliminé par 3 lavages (lavage avec solution R2 diluée, laveur automatique LP 35).

Les conjugués appropriés, dilués à la concentration finale de 1 ou 2 µg/ml sont distribués à raison de 100 µl par cupule et les plaques incubées à nouveau pendant une heure à 37° C (incubation IPS).

L'excès de conjugué est éliminé par 4 lavages successifs (solution R2 diluée - laveur LP 35).

La présence de conjugué fixé sur les plaques est révélée après addition de 100 µl de solution de révélation préparée avant emploi (1 ml de R9 et 10 ml de R8) et après incubation pendant 30 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

La réaction enzymatique est finalement bloquée par addition de 100 µl de réactif R10 (H2SO4 1N) dans toutes les cupules.

La lecture est effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaque approprié à double longueur d'onde (450/620 nm).

Les résultats peuvent être interprétés en utilisant comme valeur seuil provisoire la moyenne d'au moins deux contrôles négatifs multiplié par un facteur 2 ou encore la moyenne de 100 sérums négatifs additionnée d'un incrément correspondant à 6 SD (*Standart Deviation* calculée sur les 100 mesures individuelles).

## 3) Résultats

Différentes combinaisons anticorps de capture et anticorps signal ont été testées en se fondant sur les propriétés des anticorps sélectionnés, et en évitant les



combinaisons d'anticorps spécifiques des mêmes épitopes en phase solide et en conjugués.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les 4 combinaisons listées ci-dessous. Ces résultats sont reproduits dans le tableau IX ci-après.

5        1. Combinaison F/28

Phase solide (Acm 166 + 87 région centrale) : conjugué anticorps 28 (C-ter)

2. Combinaison G/28

Phase solide (Acm 86 - épitope conformationel) : conjugué anticorps 28 (C-ter)

3. Combinaison H/28

10      Phase solide (Acms 86, 166 et 87 région centrale et épitope conformationel) : conjugué anticorps 28 (C-ter)

4. Combinaison H/28 + 87

Phase solide (Acms 86, 166 et 87 région centrale et épitope conformationel) : conjugué mixte anticorps 28 (C-ter) et 87 (central)

15        5. Combinaison G/87

Phase solide (Acm 86 - épitope conformationel) : conjugué anticorps 87 (région centrale)

Les 4 premières combinaisons présentent des performances équivalentes et reproduites, supérieures aux autres combinaisons mises en œuvre  
20 (comme par exemple la combinaison G/87). Bien entendu, dans ces combinaisons, un anticorps monoclonal peut être remplacé par un autre anticorps reconnaissant le même épitope. Ainsi, on peut citer les variantes suivantes :

6. Variante de la combinaison F/28

Phase solide (Acm 87 uniquement) : conjugué anticorps 57 (C-ter)

25        7. Variante de la combinaison G/28

Phase solide (Acm 86 - épitope conformationel) : conjugué anticorps 57 (C-ter)

8. Variante de la combinaison H/28

Phase solide (Acms 86 et 87 région centrale et épitope conformationel) : conjugué anticorps 57 (C-ter)

30        9. Variante de la combinaison H/28 + 87

Phase solide (Acms 86 et 87 région centrale et épitope conformationel) : conjugué mixte anticorps 57 (C-ter) et 87 (central)

Tableau IX : Contrôle d'immunoréactivité des Acm anti nucléoprotéines SARS CoV : densités optiques mesurées avec chaque combinaison d'anticorps, en fonction des dilutions de l'antigène viral inactivé.

N°	Dilution	F/28	G/28	G/87	H/28	H/28+87
0	1/100	5	5	3,495	3,900	5
1	1/500	3,795	3,814	1,379	3,702	3,804
2	1/2 500	2,815	2,950	0,275	3,268	2,680
3	1/12 500	0,987	1,038	0,135	1,374	0,865
4	1/62 500	0,404	0,348	0,125	0,480	0,328
5	1/312 500	0,285	0,211	0,123	0,240	0,215
6	Témoin	0,210	0,200	0,098	0,186	0,156
7	Témoin	0,269	0,153	0,104	0,193	0,202

5

La limite de détection de ces 4 essais expérimentaux correspond à la dilution d'antigène en sérum négatif 1:62500. Une extrapolation rapide laisse supposer la détection de moins de  $10^3$  particules infectieuses par ml de sérums.

De cette étude, il ressort que les anticorps les mieux appropriés pour la capture de la nucléoprotéine virale native sont les anticorps spécifiques de la région centrale et/ou d'un épitope conformationnel, l'un et l'autre étant des anticorps sélectionnés également pour leur forte affinité pour l'antigène natif.

Ayant déterminé les meilleurs anticorps pour la composition de la phase solide, les anticorps à retenir en priorité pour la détection des antigènes fixés sur la phase solide, sont les anticorps complémentaires spécifiques d'un épitope dominant en région C-ter. L'emploi de tout autre anticorps complémentaire, mais spécifique des épitopes localisés en région N-ter de la protéine conduit à des résultats moyens ou médiocres.

#### **Exemple 11 : Systèmes d'expression eucaryotes de la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV)**

##### **1) Optimisation des conditions d'expression de la S du SRAS-CoV en cellules de mammifères.**

Les conditions d'expression transitoire de la protéine de spicule (S) du SRAS-CoV ont été optimisées en cellules de mammifères (293T, VeroE6).

Pour cela, un fragment d'ADN contenant le cDNA de la S du SRAS-CoV a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides 5'-ATAGGATCCA CCATGTTTAT TTTCTTATTA TTTCTTACTC TCACT-3' et 5'-ATACTCGAGTT

ATGTGTAATG TAATTTGACA CCCTTG-3' à partir du plasmide pSARS-S (C.N.C.M. n° I-3059) puis inséré entre les sites BamH1 et Xho1 du plasmide pTRIPΔU3-CMV contenant un vecteur lentiviral TRIP (Sirven, 2001, Mol. Ther., 3, 438-448) pour obtenir le plasmide pTRIP-S. Le fragment BamH1 et Xho1 contenant  
5 le cDNA de la S a ensuite été sous-cloné entre les BamH1 et Xho1 du plasmide d'expression eucaryote pcDNA3.1(+) (Clontech) pour obtenir le plasmide pcDNA-S. Le fragment Nhe1 et Xho1 contenant le cADN de la S a ensuite été sous-cloné entre les sites correspondants du plasmide d'expression pCI (Promega) pour obtenir le plasmide pCI-S. Les séquences WPRE du virus de l'hépatite de la marmotte  
10 ("*Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element*") et les séquences CTE ("*constitutive transport element*") du rétrovirus simien de Mason-Pfizer ont été insérées dans chacun des deux plasmides pcDNA-S et pCI-S entre les sites Xho1 et Xba1 pour obtenir respectivement les plasmides pcDNA-S-CTE, pcDNA-S-WPRE, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE (figure 21). Le plasmide pCI-S-WPRE  
15 a été déposé à la CNCM, le 22 novembre 2004, sous le numéro I-3323. Tous les inserts ont été séquencés à l'aide d'un kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) et d'un séquenceur automatique ABI377.

La capacité des plasmides construits à diriger l'expression de la S du SRAS-CoV dans des cellules de mammifères a été recherchée après transfection de  
20 cellules VeroE6 (figure 22). Dans cette expérience, des monocouches de  $5 \times 10^5$  cellules VeroE6 en boîtes de Pétri de 35mm ont été transfectées avec 2 µg des plasmides pcDNA (à titre de contrôle), pcDNA-S, pCI et pCI-S et 6 µl de réactif Fugene6 selon les indications du fabricant (Roche). Après 48 heures d'incubation à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>, des extraits cellulaires ont été préparé en tampon de dépôt  
25 selon Laemmli, séparés sur un gel SDS à 8% de polyacrylamide, puis transférés sur une membrane de PVDF (BioRad). La détection de cette immunoempreinte (« western blot ») a été réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S (immun-sérum du lapin P11135 : cf exemple 4 ci-dessus) et d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les IgG de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). Les anticorps fixés  
30 ont été révélés par luminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et de films d'autoradiographie Hyperfilm MP (Amersham).

Cette expérience (figure 22) montre que le plasmide pcDNA-S ne permet pas de diriger l'expression de la S du SRAS-CoV à des niveaux détectables tandis que le plasmide pCI-S permet une expression faible, proche de la limite de détection, qui peut être mise en évidence lorsque le film est surexposé. Des résultats  
5 similaires ont été obtenus lorsque l'expression de la S a été recherchée par immunofluorescence (données non montrées). Cette impossibilité de détecter une expression efficace de la S ne peut pas être imputée aux techniques de détection utilisées puisque la protéine S peut être mise en évidence à la taille attendue (180 kDa) dans un extrait de cellules infectées par le SRAS-CoV ou dans un extrait de cellules  
10 VeroE6 infectées par le virus recombinant de la vaccine VV-TF7.3 et transfectées par le plasmide pcDNA-S. Dans cette dernière expérience, le virus VV-TF7.3 exprime l'ARN polymérase du phage T7 et permet la transcription cytoplasmique d'un ARN non coiffé susceptible d'être traduit efficacement. Cette expérience suggère que les défauts d'expression décrits ci-dessus sont dus à une incapacité intrinsèque du cADN  
15 de la S à être exprimé efficacement lorsque l'étape de transcription en ARN messager est réalisée au niveau nucléaire.

Dans une seconde expérience, l'effet des signaux CTE et WPRE sur l'expression de la S a été recherchée après transfection de cellules VeroE6 (figure 23A) et 293T (figure 23B) et selon un protocole similaire à celui décrit ci-dessus.  
20 Alors que l'expression de la S ne peut pas être mis en évidence après transfection des plasmides pcDNA-S-CTE et pcDNA-S-WPRE dérivés de pcDNA-S, l'insertion des signaux WPRE et CTE améliore fortement l'expression de la S dans le contexte du plasmide d'expression pCI-S.

Pour préciser ce résultat, une deuxième série d'expériences a été  
25 réalisée, où l'immunoempreinte est révélée de façon quantitative par luminescence et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad). L'analyse des résultats obtenus avec le logiciel QuantityOne v4.2.3 (BioRad) montre que les séquences WPRE et CTE augmentent respectivement l'expression de la S d'un facteur 20 à 42 et 10 à 26 en cellules Vero E6 (Tableau X). En cellules 293T (Tableau X),  
30 l'effet de la séquence CTE est plus modéré (4 à 5 fois) tandis que celui de la séquence WPRE reste important (13 à 28 fois).

- Tableau X** analyse quantitative de l'effet des signaux CTE et WPRE sur l'expression de la S du SRAS-CoV : Des extraits cellulaires ont été préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 ou 293T par les plasmides pCI, pCI-S, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE et analysés par western blot comme décrit dans la légende de la figure 22. Le western blot est révélé par luminescence (ECL+, Amersham) et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad). Les niveaux d'expression sont indiqués en fonction d'une échelle arbitraire où la valeur de 1 représente le niveau mesuré après transfection du plasmide pCI-S.
- Deux expériences indépendantes ont été réalisées pour chacun des deux types cellulaires. Dans l'expérience 1 sur cellules VeroE6, les transfections ont été réalisées en dupliqués et les résultats sont indiqués sous la forme de moyennes et écart-types des niveaux d'expression mesurés.

Plasmide	Cellule	exp. 1	exp. 2
PCI	VeroE6	0,0	0,0
pCI-S	VeroE6	1,0±0,1	1,0
pCI-S-CTE	VeroE6	9,8 ±0,9	26,4
pCI-S-WPRE	VeroE6	20,1±2,0	42,3
PCI	293T	0,0	0,0
PCI-S	293T	1,0	1,0
PCI-S-CTE	293T	4,6	4,0
PCI-S-WPRE	293T	27,6	12,8

- En résumé, l'ensemble de ces résultats montre que l'expression dans des cellules de mammifères du cADN de la S du SRAS-CoV sous la dépendance de séquences promotrices de l'ARN polymérase II, requiert, pour être efficace, la présence d'un signal d'épissage ainsi que de l'une ou l'autre des séquences WPRE et CTE.

## 2) Obtention de lignées stables permettant l'expression de la S du SRAS-CoV

Le cADN de la protéine S du SRAS-CoV a été cloné sous la forme d'un fragment BamH1-Xho1 dans le plasmide pTRIPΔU3-CMV contenant un vecteur lentiviral défectif TRIP à DNA flap central (Sirven et al, 2001, Mol. Ther., 3 :438-448) pour obtenir le plasmide pTRIP-S (figure 24). La co-transfection transitoire selon Zennou et al (2000, Cell, 101 : 173-185) de ce plasmide, d'un plasmide d'encapsidation (p8.2) et d'un plasmide d'expression de la glycoprotéine d'enveloppe G du VSV (pHCMV-G) dans des cellules 293T a permis la préparation de pseudoparticules rétrovirales contenant le vecteur TRIP -S et pseudotypées par la protéine d'enveloppe G. Ces vecteurs TRIP-S pseudotypés ont été utilisés pour transduire des cellules 293T et FRhK-4 : aucune expression de la protéine S n'a pu être mise en évidence par western blot et immunofluorescence dans les cellules transduites (données non présentées).

Les cassettes d'expression optimales constituées du promoteur immédiat/précoce du virus CMV, d'un signal d'épissage, du cDNA de la S et de l'un ou l'autre des signaux post-transcriptionnels WPRE ou CTE décrites ci-dessus ont alors été substituées à la cassette EF1α-EGFP du vecteur d'expression lentiviral défectif à DNA FLAP central TRIPΔU3-EF1α (Sirven et al, 2001, Mol. Ther., 3 :438-448) (figure 25). Ces substitutions ont été réalisées par une série de sous-clonages successifs des cassettes d'expression de S qui ont été excisées des plasmides pCT-S-CTE (BglII-ApaI) ou respectivement pCI-S-WPRE (BglII-SalI) puis insérées entre les sites MluI et KpnI ou respectivement MluI et XhoI du plasmide TRIPΔU3-EF1α pour obtenir les plasmides pTRIP-SD/SA-S-CTE et pTRIP-SD/SA-S-WPRE, déposés à la CNM, le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous les numéros I-3336 et I-3334, respectivement. Des vecteurs pseudotypés ont été produits selon Zennou et al (2000, Cell, 101 : 173-185) et utilisés pour transduire des cellules 293T (10000 cellules) et FRhK-4 (15000 cellules) selon une série de 5 cycles successifs de transduction avec une quantité de vecteur correspondant à 25 ng (TRIP-SD/SA-S-CTE) ou 22 ng TRIP-SD/SA-S-WPRE) de p24 par cycle.

Les cellules transduites ont été clonées par dilution limite et une série de clones ont été analysés pour l'expression de la S du SRAS-CoV

qualitativement par immunofluorescence (données non montrées), puis quantitativement par western blot (figure 25) à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S. Les résultats présentés dans la figure 25 montrent que les clones 2 et 15 de cellules FrhK4-s-CTE transduites par TRIP-SD/SA-S-CTE et les clones 4, 9 et 12 de  
5 cellules FRhK4-S-WPRE transduites par TRIP-SD/SA-S-WPRE permettent l'expression de la S du SRAS-CoV à des niveaux respectivement faibles et modérés si on les compare à ceux que l'on peut observer au cours de l'infection par le SRAS-CoV.

En résumé, les vecteurs TRIP-SD/SA-S-CTE et TRIP-SD/SA-S-  
10 WPRE permettent l'obtention de clones stables de cellules FRhK-4 et de façon similaire 293T exprimant la S du SRAS-CoV, alors que les essais réalisés avec le vecteur "de base" TRIP-S sont restés infructueux, ce qui démontre la nécessité d'un signal d'épissage ainsi que de l'une, ou l'autre, des séquences CTE et WPRE pour l'obtention de clones cellulaires stables exprimant la protéine S.

15 En outre, ces modifications du vecteur TRIP (insertion d'un signal d'épissage et d'un signal post-transcriptionnel comme CTE et WPRE) pourraient s'avérer intéressantes pour améliorer l'expression d'autres cDNA que celui de la S.

3) Obtention de lignées stables permettant l'expression d'une forme soluble de la S du SRAS-CoV. Purification de cet antigène recombinant

20 Un cDNA codant pour une forme soluble de la protéine S (Ssol) a été obtenu en fusionnant les séquences codant pour l'ectodomaine de la protéine (acides aminés 1 à 1193) à celles d'une étiquette (FLAG : DYKDDDDK) *via* un linker BspE1 codant pour le dipeptide SG. Pratiquement, pour obtenir le plasmide pcDNA-Ssol, un fragment d'ADN codant pour l'ectodomaine de la S du SRAS-CoV a été  
25 amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides 5'-ATAGGATCCA CCATGTTTAT TTTCTTATTA TTTCTTACTC TCACT-3' et 5'-ACCTCCGGAT TTAATATATT GCTCATATTT TCCCAA-3' à partir du plasmide pcDNA-S, puis inséré entre les sites uniques BamH1 et BspE1 uniques d'un plasmide d'expression eucaryote pcDNA3.1(+) (Clontech) modifié contenant entre ses sites BamH1 et Xho1 la  
30 séquence de l'étiquette FLAG :

100

```

// GGATCC ...nnn... TCC GGA GAT TAT AAA GAT GAC GAC GAT AAA TAA
   BamH1             S  G  D  Y  K  D  D  D  D  K  ter
CTCGAG //
Xho1

```

5

Les fragments Nhe1-Xho1 et BamH1-Xho1, contenant le cADN de la S, ont ensuite été excisés du plasmide pcDNA-Ssol, et sous-clonés entre les sites correspondants du plasmide pTRIP-SD/SA-S-CTE et du plasmide pTRIP-SD/SA-S-WPRE, respectivement, pour obtenir les plasmides pTRIP-SD/SA-Ssol-CTE et pTRIP-SD/SA-Ssol-WPRE, déposés à la CNCM, le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous les numéros I-3337 et I-3335, respectivement.

Des vecteurs pseudotypés ont été produits selon Zennou et coll. (2000, Cell, 101 : 173-185) et utilisés pour transduire des cellules FRhK-4 (15000 cellules) selon une série de 5 cycles successifs de transduction (15000 cellules) avec une quantité de vecteur correspondant à 24 ng (TRIP-SD/SA-Ssol-CTE) ou 40 ng TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE) de p24 par cycle. Les cellules transduites ont été clonées par dilution limite et une série de 16 clones transduits par TRIP-SD/SA-Ssol-CTE et de 15 clones par TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE ont été analysés pour l'expression du polypeptide Ssol par western blot révélé par un anticorps monoclonal anti-FLAG (figure 26 et données non montrées), ainsi que par un ELISA-capture spécifique du polypeptide Ssol qui a été mis au point dans ce but (Tableau XI et données non montrées). Une partie du processus de sélection des meilleurs clones sécréteurs est montré dans la figure 26. L'ELISA-capture repose sur l'utilisation de phases solides recouvertes d'anticorps polyclonaux de lapins immunisés par du SRAS-CoV purifié et inactivé. Ces phases solides permettent la capture du polypeptide Ssol sécrété dans les surnageants cellulaires, dont la présence est ensuite révélée par une série d'étapes impliquant successivement la fixation d'un anticorps monoclonal anti-FLAG (M2, SIGMA), d'anticorps biotinylés polyclonaux de lapin anti-IgG(H+L) de souris (Jackson) et d'un conjugué streptavidine-peroxidase (Amersham) puis l'addition de chromogène et de substrat (TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KPL).

30



- Tableau XI** : analyse de l'expression de polypeptide Ssol par des lignées cellulaires transduites par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-CTE. La sécrétion du polypeptide Ssol a été recherchée dans le surnageant d'une série de clones cellulaires isolés après transduction de cellules FRhK-4 par les vecteurs lentiviraux TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-CTE. Les surnageants dilués au 1/50 ont été analysés par un test ELISA-capture spécifique de la S du SRAS-CoV.

Vecteur	Clone	DO (450 nm)
Témoin	-	0,031
TRIP-SD/SA-Ssol-CTE	CTE2	0,547
	CTE3	0,668
	CTE9	0,171
	CTE12	0,208
	CTE13	0,133
TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE	WPRE1	0,061
	WPRE10	0,134

- La lignée cellulaire sécrétant les quantités les plus élevées de polypeptide Ssol dans le surnageant de culture est la lignée FRhK4-Ssol-CTE3. Elle a été soumise à une deuxième série de 5 cycles de transduction par le vecteur TRIP-SD/SA-Ssol-CTE dans des conditions similaires à celles décrites ci-dessus puis clonée. Le sous-clone sécrétant les quantités les plus élevés de Ssol a été sélectionné par une combinaison d'analyse par western blot et ELISA-capture : il s'agit du sous-clone FRhK4-Ssol-30, qui a été déposé à la CNCM, le 22 novembre 2004, sous le numéro I-3325.

- La lignée FRhK4-Ssol-30 permet la production et la purification en quantité du polypeptide recombinant Ssol. Dans une expérience type où les conditions expérimentales de croissance, de production et de purification ont été optimisées, les cellules de la lignée FRhK4-Ssol-30 sontensemencées en milieu de culture standard (DMEM sans pyruvate contenant 4.5g/l de glucose et supplémenté par 5% de SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) sous la forme d'une monocouche sous-confluente (1 million de cellules pour chaque 100 cm<sup>2</sup> dans 20 ml de milieu). A confluence, le milieu standard est remplacé par le milieu de sécrétion où

la quantité de SVF est abaissée à 0.5% et la quantité de milieu réduite à 16 ml pour chaque 100 cm<sup>2</sup>. Le surnageant de culture est prélevé après 4 à 5 jours d'incubation à 35°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>. Le polypeptide recombinant Ssol est purifié à partir du surnageant par l'enchaînement d'étapes de filtration sur membrane de polyethersulfone (PES) de 0.1 µm, de concentration par ultrafiltration sur une membrane de PES de point de coupure 50kD, de chromatographie d'affinité sur matrice anti-FLAG avec élution par une solution de peptide FLAG (DYKDDDDK) à 100 µg/ml en TBS (Tris 50mM pH 7.4, 150 mMNaCl) puis de chromatographie de gel filtration en TBS sur billes de sephadex G-75 (Pharmacia). La concentration du polypeptide recombinant Ssol purifié a été déterminée par test micro-BCA (Pierce) puis ses caractéristiques biochimiques analysées.

L'analyse par gel SDS à 8 % d'acrylamide coloré au nitrate d'argent met en évidence un polypeptide majoritaire dont la masse moléculaire est d'environ 180kD et dont le degré de pureté peut être évalué à 98% (figure 27A). Par spectrométrie de masse SELDI-TOF (Cypherger), deux pics principaux sont mis en évidence : ils correspondent à des formes simplement, et doublement chargées d'un polypeptide majoritaire dont la masse moléculaire est ainsi déterminée à  $182,6 \pm 3,7$  kD (figures 27B et C). Après transfert sur membrane Prosorb et rinçage en TFA 0,1%, l'extrémité N-terminale du polypeptide Ssol a été séquencée en phase liquide par dégradation d'Edman sur 5 résidus (ABI494, Applied Biosystems) et déterminée comme étant SDLDR (figure 27D). Ceci démontre que le peptide signal localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine S du SRAS-CoV, composé des aa 1 à 13 (MFIFLLFLTLTSG) d'après une analyse réalisée avec le logiciel signalP v2.0 (Nielsen et al., 1997, *Protein Engineering*, 10 : 1-6), est clivé du polypeptide Ssol mature. Le polypeptide recombinant Ssol est donc constitué des acides aminés 14 à 1193 de la protéine S du SRAS-CoV fusionnés en C-terminal à une séquence SGDYKDDDDK contenant la séquence de l'étiquette FLAG (soulignée). L'écart entre la masse molaire théorique du polypeptide Ssol nu (132,0 kD) et la masse molaire réelle du polypeptide mature (182,6 kD) suggère que le polypeptide Ssol est glycosylé.

Une préparation de polypeptide Ssol purifié et dont la concentration protéique a été déterminée par test micro-BCA, permet de réaliser une gamme étalon

pour mesurer à l'aide du test ELISA-capture décrit plus haut les concentrations de Ssol présent dans les surnageants de culture et de revisiter les caractéristiques des lignées sécrétrices. Selon ce test, la lignée FRhK4-Ssol-CT3 sécrète 4 à 6 µg/ml de polypeptide Ssol tandis que la lignée FRhK4-Ssol-30 sécrète 9 à 13 µg/ml de Ssol après 4 à 5 jours de culture à confluence. En outre, le schéma de purification présenté plus haut permet en routine de purifier de 1 à 2 mg de polypeptide Ssol par litre de surnageant de culture.

**Exemple 12 : Immunisation génique visant la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV)**

10 L'effet d'un signal d'épissage et des signaux post-transcriptionnels WPRE et CTE a été analysé après immunisation génique de souris BALB/c (figure 28).

Pour cela, des souris BALB/c ont été immunisées à des intervalles de 4 semaines par injection dans le *tibialis anterior* d'une solution saline de 50 µg d'ADN plasmidique de pcDNA-S et pCI-S ainsi que, à titre de contrôle, par 50 µg d'ADN plasmidique de pcDNA-N (dirigeant l'expression de la N du SRAS-CoV) ou de pCI-HA (dirigeant l'expression de la HA du virus grippal A/PR/8/34) et les sérums immuns collectés 3 semaines après la 2ème injection. La présence d'anticorps dirigés contre la S du SRAS-CoV a été recherchée par ELISA indirect en utilisant comme 20 antigène un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV et à titre de contrôle, un lysat de cellules VeroE6 non infectées. Les titres (TI) en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 (différence entre DO mesurée sur lysat de cellules infectées et DO mesurée sur lysat de cellules non infectées) après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG de 25 souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) et du TMB additionné de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KPL) (figure 28A).

Dans ces conditions, le plasmide d'expression pcDNA-S ne permet l'induction que de faibles titres d'anticorps dirigées contre la S du SRAS-CoV chez 3 souris sur 6 ( $\text{LOG}_{10}(\text{TI})=1,9\pm0,6$ ) alors que le plasmide pcDNA-N permet l'induction d'anticorps anti-N à des titres élevés ( $\text{LOG}_{10}(\text{TI})= 3,9\pm0,3$ ) chez tous les animaux, et les plasmides contrôles (pCI, pCI-HA) n'entraînent aucun anticorps détectable ( $\text{LOG}_{10}(\text{TI})<1,7$ ). Le plasmide pCI-S muni d'un signal d'épissage permet l'induction

d'anticorps à des titres élevés ( $\text{LOG}_{10}(\text{TI}) = 3,7 \pm 0,2$ ), qui sont environ 60 fois supérieurs à ceux observés après injection du plasmide pcDNA-S ( $p < 10^{-5}$ ).

L'efficacité des signaux post-transcriptionnels a été étudiée en réalisant une étude dose-réponse des titres en anticorps anti-S induits chez la souris BALB/c en fonction de la quantité d'ADN plasmidique utilisé comme immunogène (2 µg, 10 µg et 50 µg). Cette étude (figure 28B) démontre que le signal post-transcriptionnel WPRE améliore fortement l'efficacité de l'immunisation génique lorsque de faibles doses d'ADN sont utilisées ( $p < 10^{-5}$  pour une dose de 2 µg d'ADN et  $p < 10^{-2}$  pour une dose de 10 µg), alors que l'effet du signal CTE reste marginal ( $p = 0,34$  pour une dose de 2 µg d'ADN).

Enfin, les anticorps induits chez la souris après immunisation génique neutralisent l'infectivité du SRAS-CoV *in vitro* (figures 29A et 29B) à des titres qui sont en rapport avec les titres mesurés par ELISA.

En résumé, l'utilisation d'un signal d'épissage et du signal post-transcriptionnel WPRE du virus de l'hépatite de la marmotte améliore de façon considérable l'induction d'anticorps neutralisants dirigés contre le SRAS-CoV après immunisation génique à l'aide d'ADN plasmidique dirigeant l'expression du cADN de la S du SRAS-CoV.

### **Exemple 13 : Applications diagnostiques de la protéine S**

La réactivité en ELISA du polypeptide recombinant Ssol a été analysée vis-à-vis de sérums de patients atteints de SRAS.

Les sérums de cas probables de SRAS testés ont été choisis sur la base des résultats (positifs ou négatifs) d'analyse de leur réactivité spécifique vis-à-vis des antigènes natifs du SRAS-CoV par test d'immunofluorescence sur cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV et/ou par test ELISA indirect en utilisant comme antigène un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV. Les sérums de ces patients sont identifiés par un numéro d'ordre du Centre National de Référence des Virus Influenzae ainsi que par les initiales du patient et le nombre de jours écoulés depuis le début des symptômes. Tous les sérums de cas probables (cf Tableau XII) reconnaissent les antigènes natifs du SRAS-CoV, à l'exception du sérum 032552 du patient VTT, pour lequel l'infection par le SRAS-CoV n'a pas pu être confirmée par RT-PCR réalisée sur prélèvements respiratoires des jours 3, 8 et 12. Un panel de

sérums témoin a été utilisé à titre de contrôle (sérums TV): il s'agit de sérums prélevés en France avant l'épidémie de SRAS survenue en 2003.

**Tableau XII : sérums de cas probables de SRAS**

sérum	patient	jour de prélèvement
031724	JYK	7
033168	JYK	38
033597	JYK	74
032632	NTM	17
032634	THA	15
032541	PHV	10
032542	NIH	17
032552	VTT	8
032633	PTU	16
032791	JLB	3
033258	JLB	27
032703	JCM	8
033153	JCM	29

- 5 Des phases solides sensibilisées par le polypeptide recombinant Ssol ont été préparées par adsorption d'une solution de polypeptide Ssol purifié à 2 µg/ml en PBS dans les puits d'une plaque ELISA, puis les plaques sont incubées une nuit à 4°C et lavées avec du tampon PBS-Tween (PBS, 0,1% Tween20). Après saturation des plaques ELISA par une solution de PBS-lait écrémé à 10% (poids/volume) et
- 10 lavage en PBS-tween, les sérums à tester (100 µl) sont dilués au 1/400 dans du tampon PBS-lait écrémé-Tween (PBS, 3% lait écrémé, 0,1% Tween) puis ajoutés dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée. Les plaques sont incubées 1h à 37°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween, le conjugué anti-IgG humaines marqué à la
- 15 peroxidase (réf NA933V, Amersham) dilué au 1/4000 dans du tampon PBS-lait écrémé-Tween est ajouté, puis les plaques sont incubées une heure à 37°C. Après 6 lavages avec du tampon PBS-Tween, le chromogène (TMB) et le substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sont ajoutés et les plaques sont incubées 10 minutes à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution 1N de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, puis l'absorbance est mesurée à 450 nm avec un référence à 620nm.

Les tests ELISA (figure 30) démontrent que le polypeptide recombinant Ssol est reconnu spécifiquement par les anticorps sériques de patients atteints de SRAS prélevés en phase moyenne ou tardive de l'infection ( $\geq 10$  jours après le début des symptômes alors qu'il n'est pas reconnu de façon significative par les anticorps sériques de deux patients (JLB et JCM) prélevés en phase précoce de l'infection (3 à 8 jours après le début des symptômes) ni par des sérums témoins de sujets non atteints de SRAS. Les anticorps sériques des patients JLB et JCM montrent une séroconversion entre les jours 3 et 27 pour le premier et 8 et 29 pour le second après le début des symptômes, ce qui confirme la spécificité de la réactivité de ces sérums vis-à-vis du polypeptide Ssol.

En conclusion, ces résultats démontrent que le polypeptide recombinant Ssol peut être utilisé comme antigène pour la mise au point d'un test ELISA de diagnostic sérologique de l'infection par le SRAS-CoV.

**Exemple 14 : Applications vaccinales de la protéine S soluble recombinante**

L'immunogénicité du polypeptide recombinant Ssol a été étudiée chez la souris.

Pour cela, un groupe de 6 souris a été immunisé à 3 semaines d'intervalle avec 10  $\mu$ g de polypeptide recombinant Ssol adjuvé par 1 mg d'hydroxyde d'aluminium (Alu-gel-S, Serva) dilué en PBS. Trois immunisations successives ont été réalisées et les sérums immuns ont été prélevés 3 semaines après chacune des immunisations (IS1, IS2, IS3). A titre de contrôle, un groupe de souris (groupe mock) a reçu de l'hydroxyde d'aluminium seul selon le même protocole.

Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des 2 groupes par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène et à titre de contrôle, un lysat de cellules VeroE6 non infectées. Les titres en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) et du TMB additionné de  $H_2O_2$  (KPL). Cette analyse (figure 31) montre que l'immunisation par le polypeptide Ssol induit chez la souris dès la première immunisation des anticorps dirigés contre la forme native de la protéine de spicule du

SRAS-CoV présente dans le lysat de cellules VeroE6 infectées. Après 2 puis 3 immunisations, les titres en anticorps anti-S deviennent très élevés.

Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des 2 groupes pour leur capacité à séroneutraliser l'infectivité du SRAS-CoV. 4 points de séroneutralisation sur cellules FRhK-4 (100 TCID<sub>50</sub> de SRAS-CoV) sont réalisés pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infectivité de 2 cupules sur 4. Cette analyse montre que les anticorps induits chez la souris par le polypeptide Ssol sont neutralisants : les titres observés sont très élevés après 2 puis 3 immunisations (supérieurs à 2560 et 5120 respectivement, Tableau XIII).

**Tableau XIII : induction d'anticorps dirigés contre le SRAS-CoV après immunisation avec le polypeptide recombinant Ssol.** Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des 2 groupes pour leur capacité à séroneutraliser l'infectivité de 100 TCID<sub>50</sub> du SRAS-CoV sur cellules FRhK-4. 4 points sont réalisés pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infectivité de 2 cupules sur 4.

groupe	sérums	Ac. Neutralisants
Mock	pi	< 20
	IS1	< 20
	IS2	< 20
	IS3	< 20
Ssol	pi	< 20
	IS1	57
	IS2	> 2560
	IS3	> 5120

Les titres neutralisants observés chez les souris immunisées avec le polypeptide Ssol atteignent des niveaux très supérieurs aux titres observés par Yang et coll. chez la souris (2004, Nature, 428: 561-564) et à ceux observés par Buchholz chez le hamster (2004, PNAS 101 : 9804-9809), qui protègent respectivement la souris et le hamster de l'infection par le SRAS-CoV. Il est donc vraisemblable que les anticorps

neutralisants induits chez la souris après immunisation par le polypeptide Ssol protègent ces animaux contre l'infection par le SRAS-CoV.

**Exemple 15 : Gène synthétique optimisé pour l'expression en cellules de mammifères de la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV).**

**1) Conception du gène synthétique**

Un gène synthétique codant pour la protéine de spicule du SRAS-CoV a été conçu à partir du gène de l'isolat 031589 (plasmide pSARS-S, C.N.C.M. n° I-3059) de façon à permettre des niveaux d'expression élevés dans des cellules de mammifères et en particulier dans les cellules d'origine humaine.

Pour cela :

- l'usage des codons du gène sauvage de l'isolat 031589 a été modifié de façon à se rapprocher du biais observé chez l'homme et à améliorer l'efficacité de traduction du mRNA correspondant
- le contenu global en GC du gène a été augmenté de façon à prolonger la demi-vie du mRNA correspondant
- les motifs, éventuellement cryptiques, susceptibles d'interférer avec une expression efficace du gène ont été supprimés (sites donneurs et accepteurs d'épissage, signaux de polyadénylation, séquences très riches (>80%) ou très pauvres (<30%) en GC, séquences répétées, séquences impliquées dans la formation de structures secondaires de l'ARN, boîtes TATA)
- un deuxième codon STOP a été ajouté pour permettre une terminaison efficace de la traduction.

En outre, des motifs CpG ont été introduits dans le gène de façon à augmenter son immunogénicité comme vaccin à ADN. Afin de faciliter la manipulation du gène synthétique, deux sites de restriction BamH1 et Xho1 ont été placés de part et d'autre de la phase ouverte de lecture de la protéine S, et les sites de restriction BamH1, Xho1, Nhe1, Kpn1, BspE1 et Sal1 ont été évités dans le gène synthétique.

La séquence du gène synthétique conçu (gène 040530) est donnée en SEQ ID No: 140.



Un alignement du gène synthétique 040530 avec la séquence du gène sauvage de l'isolat 031589 du SRAS-CoV déposé à la C.N.C.M. sous le numéro I-3059 (SEQ ID NO : 4, plasmide pSRAS-S) est présenté dans la figure 32.

## 2) Constructions plasmidiques

5 Le gène synthétique SEQ ID No: 140 a été assemblé à partir d'oligonucléotides synthétiques et cloné entre les sites Kpn1 et Sac1 du plasmide pUC-Kana pour donner le plasmide 040530pUC-kana. La séquence nucléotidique de l'insert du plasmide 040530pUC-kana a été vérifiée par séquençage automatique (Applied).

10 Un fragment Kpn1-Xho1 contenant le gène synthétique 040530 a été excisé du plasmide 040530pUC-kana et sous-cloné entre les sites Nhe1 et Xho1 du plasmide d'expression pCI (Promega) pour obtenir le plasmide pCI-SSYNTH, déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous le numéro I-3333.

Un gène synthétique codant pour la forme soluble de la protéine S a  
15 ensuite été obtenu en fusionnant les séquences synthétiques codant pour l'ectodomaine de la protéine S (acides aminés 1 à 1193) à celles de l'étiquette (FLAG : DYKDDDDK) via un linker BspE1 codant pour le dipeptide SG. Pratiquement, un fragment d'ADN codant pour l'ectodomaine de la S du SRAS-CoV a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides 5'-ACTAGCTAGC GGATCCACCA  
20 TGTTTCATCTT CCTG -3' et 5'- AGTATCCGGAC TTGATGTACT GCTCGTACTT GC-3' à partir du plasmide 040530pUC-kana, digéré par Nhe1 et BspE1 puis inséré entre les sites uniques Nhe1 et BspE1 du plasmide pCI-Ssol, pour donner le plasmide pCI-SCUBE, déposé à la CNCM le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous le numéro I-3332. (Les plasmides pCI-Ssol, pCI-Ssol-CTE et pCI-Ssol-WPRE (déposé à la CNCM, le 22  
25 novembre 2004, sous le numéro I-3324) avaient été précédemment obtenus par sous-clonage du fragment Kpn1-Xho1 excisé du plasmide pcDNA-Ssol (voir note technique de la DI 2004-106) entre les sites Nhe1 et Xho1 des plasmides pCI, pCI-S-CTE et pCI-S-WPRE respectivement.)

Les plasmides pCI-Scube et pCI-Ssol codent pour le même  
30 polypeptide recombinant Ssol.

## 3) Résultats

La capacité du gène synthétique codant pour la protéine S à diriger efficacement l'expression de la S du SRAS-CoV dans des cellules de mammifères a été comparée à celle du gène sauvage après transfection transitoire de cellules de primates (VeroE6) et de cellules humaines (293T).

5 Dans l'expérience présentée par la figure 33 et au Tableau XIV, des monocouches de  $5 \times 10^5$  cellules VeroE6 ou  $7 \times 10^5$  cellules 293T en boîtes de Pétri de 35mm ont été transfectées avec 2  $\mu$ g des plasmides pCI (à titre de contrôle), pCI-S, pCI-S-CTE, pCI-S-WPRE et pCI-Ssynth et 6  $\mu$ l de réactif Fugene6 selon les indications du fabricant (Roche). Après 48 heures d'incubation à 37°C et sous 5% de  
10 CO<sub>2</sub>, des extraits cellulaires ont été préparés en tampon de dépôt selon Laemmli, séparés sur un gel SDS à 8% de polyacrylamide puis transférés sur une membrane de PVDF (BioRad). La détection de cette immunoempreinte (« western blot ») a été réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S (immun-sérum du lapin P11135 : cf exemple 4 ci-dessus) et d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les  
15 IgG de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). L'immunoempreinte est révélée de façon quantitative par luminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad).

L'analyse des résultats obtenus avec le logiciel QuantityOne v4.2.3 (BioRad) montre que dans cette expérience, le plasmide pCI-Synth permet  
20 l'expression transitoire de la protéine S à des niveaux élevés dans les cellules VeroE6 et 293T, alors que le plasmide pCI-S ne permet pas d'induire une expression à des niveaux suffisants pour être détectée. Les niveaux d'expression observés sont de l'ordre de 2 fois supérieurs à ceux observés avec le plasmide pCI-S-WPRE.

- Tableau XIV : utilisation d'un gène synthétique pour l'expression de la S du SRAS-CoV.** Des extraits cellulaires préparés 48 heures après transfection de cellules VeroE6 ou 293T par les plasmides pCI, pCI-S, pCI-S-CTE, pCI-S-WPRE et pCI-Ssynth ont été séparés sur un gel SDS à 8% d'acrylamide et analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-S et d'un anticorps polyclonal anti-IgG(H+L) de lapin couplé à la peroxidase (NA934V, Amersham). Le western blot est révélé par luminescence (ECL+, Amersham) et acquisition sur un dispositif d'imagerie numérique (FluorS, BioRad). Les niveaux d'expression de la protéine S ont été mesurés en quantifiant les 2 bandes majoritaires repérées sur l'image (voir figure 33) et sont indiqués en fonction d'une échelle arbitraire où la valeur de 1 représente le niveau mesuré après transfection du plasmide pCI-S-WPRE.

plasmide	VeroE6	293T
pCI	0,0	0,0
pCI-S	≤ 0,1	≤ 0,1
pCI-S-CTE	0,5	≤ 0,1
pCI-S-WPRE	1,0	1,0
PCI-Ssynth	1,8	1,9

- Dans un second temps, la capacité du gène synthétique Scube à diriger efficacement la synthèse et la sécrétion du polypeptide Ssol par des cellules de mammifères a été comparée à celle du gène sauvage après transfection transitoire de cellules de hamster (BHK-21) et de cellules humaines (293T).

- Dans l'expérience présentée par le Tableau XV, des monocouches de  $6 \times 10^5$  cellules BHK-21 et de  $7 \times 10^5$  cellules 293T en boîtes de Pétri de 35mm ont été transfectées avec 2  $\mu$ g des plasmides pCI (à titre de contrôle), pCI-Ssol, pCI-Ssol-CTE, pCI-Ssol-WPRE et pCI-Scube et 6  $\mu$ l de réactif Fugene6 selon les indications du fabricant (Roche). Après 48 heures d'incubation à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>, les surnageants cellulaires ont été prélevés et analysés de façon quantitative pour la sécrétion du polypeptide Ssol par un test ELISA-capture spécifique du polypeptide Ssol.

- L'analyse des résultats montre que, dans cette expérience, le plasmide pCI-Scube permet l'expression du polypeptide Ssol à des niveaux 8 fois (cellules BHK-21) à 20 fois (cellules 293T) plus élevés que le plasmide pCI-Ssol. Les niveaux d'expression observés sont de l'ordre de 2 fois (cellules 293T) à 5 fois (cellules BHK-21) supérieurs à ceux observés avec le plasmide pCI-Ssol-WPRE.

- Tableau XV : utilisation d'un gène synthétique pour l'expression du polypeptide Ssol.** Les surnageants ont été récoltés 48 heures après transfection de cellules BHK ou 293T par les plasmides pCI, pCI-Ssol, pCI-Ssol-CTE, pCI-Ssol-WPRE et pCI-Scube et analysés de façon quantitative pour la sécrétion du polypeptide Ssol par un test ELISA-capture spécifique du polypeptide Ssol. Les transfections ont été réalisées en dupliqués et les résultats sont indiqués sous la forme de moyennes et écart-types des concentrations de polypeptide Ssol (ng/ml) mesurées dans les surnageants.

Plasmide	BHK	293T
Pci	< 20	< 20
pCI-Ssol	< 20	56 ± 10
pCI-Ssol-CTE	< 20	63 ± 8
pCI-Ssol-WPRE	28 ± 1	531 ± 15
PCI-Scube	152 ± 6	1140 ± 20

- En résumé, ces résultats montrent que l'expression dans des cellules de mammifères du gène synthétique 040530 codant pour la S du SRAS-CoV sous la dépendance de séquences promotrices de l'ARN polymérase II est bien plus efficace que celle du gène sauvage de l'isolat 031589. Cette expression est même plus efficace que celle dirigée par le gène sauvage en présence des séquences WPRE du virus de l'hépatite de la marmotte.

#### 4) Applications

- L'utilisation du gène synthétique 040530 codant pour la S du SRAS-CoV ou de sa variante Scube codant pour le polypeptide Ssol est susceptible de remplacer avantageusement le gène sauvage dans de nombreuses applications où l'expression de la S est nécessaire à des niveaux élevés. En particulier pour :

- améliorer l'efficacité de l'immunisation génique par des plasmides du type pCI-Ssynth voire pCI-Ssynth-CTE ou pCI-Ssynth-WPRE
- établir de nouvelles lignées cellulaires exprimant des quantités plus élevées de la protéine S ou du polypeptide Ssol à l'aide de vecteurs lentiviraux recombinants porteurs du gène Ssynth ou du gène Scube respectivement
- améliorer l'immunogénicité des vecteurs lentiviraux recombinants permettant l'expression de la protéine S ou du polypeptide Ssol
- améliorer l'immunogénicité de vecteurs vivants permettant l'expression de la protéine S ou du polypeptide Ssol comme des virus recombinants de la vaccine ou des virus rougeole recombinants (voir exemples 16 et 17 ci-après)

**Exemple 16 : Expression de la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV) à l'aide de virus recombinants de la Vaccine.**

**Application vaccinale.**

**Application à la production d'une forme soluble de la protéine de spicule (S) et conception d'un test de sérologie du SRAS.**

### **1) Introduction**

Le but de cet exemple est d'évaluer la capacité de virus recombinants de la vaccine (VV) exprimant différents antigènes du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV) à constituer de nouveaux candidats vaccins contre le SRAS et un moyen de produire des antigènes recombinants en cellules de mammifères.

Pour cela, les inventeurs se sont intéressés à la protéine de spicule (S) du SRAS-CoV, qui permet d'induire après immunisation génique chez l'animal des anticorps neutralisants l'infectivité du SRAS-CoV, ainsi qu'à une forme soluble et sécrétée de cette protéine, le polypeptide Ssol, qui est composé de l'ectodomaine (aa 1-1193) de la S fusionné en son extrémité C-ter à une étiquette FLAG (DYKDDDDK) via un linker BspE1 codant pour le dipeptide SG. Ce polypeptide Ssol présente une antigénicité similaire à celle de la protéine S et permet, après injection à la souris sous la forme d'une protéine purifiée adjuvée en hydroxide d'aluminium, l'induction de titres élevés d'anticorps neutralisants contre le SRAS-CoV.

Les différentes formes du gène S ont été placées sous la dépendance du promoteur du gène 7.5K puis introduites au sein du locus de la thymidine kinase (TK) de la souche Copenhague du virus de la vaccine par double recombinaison homologue *in vivo*. Afin d'améliorer l'immunogénicité des virus vaccine recombinants, un promoteur tardif synthétique a été choisi à la place du promoteur 7.5K, pour augmenter la production de S et Ssol au cours des phases tardives du cycle viral.

Après avoir isolé les virus vaccine recombinants et vérifié leur capacité à exprimer l'antigène S du SRAS-CoV, leur capacité à induire chez la souris une réponse immunitaire contre le SRAS a été testée. Après avoir purifié l'antigène Ssol du surnageant de cellules infectées, un test ELISA de sérodiagnostic du SRAS a été conçu, et son efficacité a été évaluée à l'aide de sérums de cas probables de SRAS.

## 2) Construction des virus recombinants

Des virus recombinants de la vaccine dirigeant l'expression de la glycoprotéine S de l'isolat 031589 du SRAS-CoV et d'une forme soluble et sécrétée de cette protéine, le polypeptide Ssol, sous la dépendance du promoteur 7.5K ont été obtenus. Dans le but d'augmenter les niveaux d'expression de S et Ssol, des virus recombinants dans lesquels les cDNA de S et de Ssol sont placés sous la dépendance d'un promoteur synthétique tardif ont également été obtenus.

Le plasmide pTG186poly est un plasmide de transfert pour la construction de virus recombinants de la vaccine (Kieny, 1986, Biotechnology, 4 :790-795). A ce titre, il contient le gène de la thymidine kinase du VV dans lequel a été inséré le promoteur du gène 7.5K suivi d'un site multiple de clonage permettant l'insertion de gènes hétérologues (figure 34A). Le promoteur du gène 7.5K contient en fait un tandem de deux séquences promotrices actives respectivement durant les phases précoces (P<sub>E</sub>) et tardives (P<sub>L</sub>) du cycle de réplication du virus de la vaccine.

Les fragments BamH1-Xho1 ont été excisés des plasmides pTRIP-S et pcDNA-Ssol respectivement et insérés entre les sites BamH1 et Sma1 du plasmide pTG186poly pour donner les plasmides pTG-S et pTG-Ssol (figure 34A). Les plasmides pTG-S et pTG-Ssol ont été déposés à la CNCM, le 2 décembre 2004, sous les numéros I-3338 et I-3339, respectivement.

Les plasmides pTN480, pTN-S et pTN-Ssol ont été obtenus à partir des plasmides pTG186poly, pTG-S et pTG-Ssol respectivement, en substituant le fragment Nde1-Pst1 contenant le promoteur 7.5K par un fragment d'ADN contenant le promoteur tardif synthétique 480, qui a été obtenu par hybridation des oligonucléotides 5'- TATGAGCTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTGCGC ATATAAATAG ACTCGGCGCG CCATCTGCA-3' et 5'- GATGGCGCGC CGAGTCTATT TATATGCCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAGC TCA-3' (figure 34B). L'insert a été séquencé à l'aide d'un kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) et d'un séquenceur automatique ABI377. La séquence du promoteur synthétique tardif 480 tel que cloné dans les plasmides de transfert de la série pTN est indiquée figure 34C. Les plasmides pTN-S et pTN-Ssol ont été déposés à la CNCM, le 2 décembre 2004, sous les numéros I-3340 et I-3341, respectivement.

Les virus recombinants de la vaccine ont été obtenus par double recombinaison homologue *in vivo* entre la cassette TK des plasmides de transfert des séries pTG et pTN et le gène TK de la souche Copenhague du virus de la vaccine selon une procédure décrite par Kieny et coll. (1984, Nature, 312 : 163-166).

5 Brièvement, des cellules CV-1 sont transfectées à l'aide de DOTAP (Roche) par de l'ADN génomique de la souche copenhague du virus de la vaccine et chacun des plasmides de transfert des séries pTG et pTN décrits ci-dessus, puis surinfectées par le virus vaccine auxiliaire VV-ts7 pendant 24 heures à 33°C. Le virus auxiliaire est contre-sélectionné par incubation à 40°C pendant 2 jours puis les virus recombinants

10 (phénotype TK-) sélectionnés par deux cycles de clonage sous milieu gélosé sur cellules 143Btk- en présence de BuDr (25 µg/ml). Les 6 virus VV-TG, VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN, VV-TN-S et VV-TN-Ssol ont été respectivement obtenus à l'aide des plasmides de transfert pTG186poly, pTG-S, pTG-Ssol, pTN480, pTN-S, pTN-Ssol. Les virus VV-TG et VV-TN n'expriment aucun gène hétérologue et ont été

15 utilisés comme contrôle TK- dans les expériences. Les préparations de virus recombinants ont été réalisés sur monocouches de cellules CV-1 ou BHK-21 et le titre en unités formant plaque (u.f.p.) déterminé sur cellules CV-1 selon Earl et Moss (1998, Current Protocols in Molecular Biology, 16.16.1-16.16.13).

### 3) Caractérisation des virus recombinants

20 L'expression des transgènes codant la protéine S et le polypeptide Ssol a été recherchée par western blot.

Des monocouches de cellules CV-1 ont été infectées à une multiplicité de 2 par les différents virus vaccine recombinants VV-TG, VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN, VV-TN-S et VV-TN-Ssol. Après 18 heures d'incubation à

25 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>, des extraits cellulaires ont été préparés en tampon de dépôt selon Laemmli, séparés sur un gel SDS à 8% de polyacrylamide puis transférés sur une membrane de PVDF (BioRad). La détection de cette immunoempreinte (« western blot ») a été réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S (immun-sérum du lapin P11135 : cf exemple 4) et d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les IgG

30 de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). Les anticorps fixés ont été révélés par luminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et de films d'autoradiographie Hyperfilm MP (Amersham).

Comme le montre la figure 35A, le virus recombinant VV-TN-S dirige l'expression de la protéine S à des niveaux qui sont comparables à ceux que l'on peut observer 8h après infection par le SRAS-CoV mais qui sont bien plus élevés que ceux que l'on peut observer après infection par VV-TG-S. Dans une deuxième expérience (figure 35B), l'analyse de quantités variables d'extraits cellulaires montre que les niveaux d'expression observés après infection par les virus de la série TN (VV-TN-S et VV-TN-Ssol) sont environ 10 fois plus élevés que ceux observés avec les virus de la série TG (VV-TG-S et VV-TG-Ssol respectivement). En outre, le polypeptide Ssol est sécrété dans le surnageant de cellules CV-1 infectées par le virus VV-TN-Ssol plus efficacement que dans le surnageant de cellules infectées par VV-TG-Ssol (figure 36A). Dans cette expérience, le virus VV-TN-Sflag a été utilisé à titre de contrôle, car il exprime la forme membranaire de la protéine S fusionnée en son extrémité C-ter à l'étiquette FLAG. La protéine Sflag n'est pas détectée dans le surnageant des cellules infectées par VV-TN-Sflag, démontrant que le polypeptide Ssol est bien sécrété de façon active après infection par VV-TN-Ssol.

Ces résultats démontrent que les virus vaccine recombinants sont bien porteurs des transgènes et permettent l'expression de la glycoprotéine du SRAS sous sa forme membranaire (S) ou sous une forme soluble et sécrétée (Ssol). Les virus vaccine porteurs du promoteur synthétique 480 permettent l'expression de S et la sécrétion de Ssol à des niveaux bien plus élevés que les virus porteurs du promoteur du gène 7.5K.

#### **4) Application à la production d'une forme soluble de la S du SRAS-CoV. Purification de cet antigène recombinant et applications diagnostiques.**

La lignée BHK-21 est la lignée cellulaire qui sécrète les quantités les plus élevées de polypeptide Ssol après infection par le virus VV-TN-Ssol parmi les lignées testées (BHK-21, CV1, 293T et FrhK-4, figure 36B); elle permet la production et la purification en quantité du polypeptide recombinant Ssol. Dans une expérience type où les conditions expérimentales d'infection, de production et de purification ont été optimisées, les cellules BHK-21 sontensemencées en milieu de culture standard (DMEM sans pyruvate contenant 4.5g/l de glucose et supplémenté par 5% de TPB, 5% de SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) sous la forme d'une monocouche sous-confluente (10 millions de cellules pour chaque



100 cm<sup>2</sup> dans 25 ml de milieu). Après 24h d'incubation à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules sont infectées à une M.O.I. de 0.03 et le milieu standard remplacé par le milieu de sécrétion où la quantité de SVF est abaissée à 0.5% et le TPB supprimé. Le surnageant de culture est prélevé après 2,5 jours d'incubation à 35°C et sous 5% de CO<sub>2</sub> et le virus de la vaccine inactivé par addition de triton X-100 (0,1%). Après filtration sur membrane de polyethersulfone (PES) de 0.1 µm, le polypeptide recombinant Ssol est purifié par une chromatographie d'affinité sur matrice anti-FLAG avec élution par une solution de peptide FLAG (DYKDDDDK) à 100 µg/ml en TBS (Tris 50mM pH 7.4, 150 mMNaCl).

10 L'analyse par gel SDS à 8 % d'acrylamide coloré au nitrate d'argent a mis en évidence un polypeptide majoritaire dont la masse moléculaire est d'environ 180kD et dont le degré de pureté est supérieur à 90% (figure 37). La concentration du polypeptide recombinant Ssol purifié a été déterminée par comparaison avec les marqueurs de masse moléculaire et estimée à 24 ng/µl.

15 Cette préparation de polypeptide Ssol purifié permet de réaliser une gamme étalon pour mesurer à l'aide d'un test ELISA-capture les concentrations de Ssol présentes dans les surnageants de culture. Selon ce test, la lignée BHK-21 sécrète environ 1 µg/ml de polypeptide Ssol dans les conditions de production décrites plus haut. En outre, le schéma de purification présenté permet de purifier de l'ordre de 160 µg de polypeptide Ssol par litre de surnageant de culture.

La réactivité en ELISA du polypeptide recombinant Ssol a été analysée vis-à-vis de sérums de patients atteints de SRAS.

Les sérums de cas probables de SRAS testés ont été choisis sur la base des résultats (positifs ou négatifs) d'analyse de leur réactivité spécifique vis à vis des antigènes natifs du SRAS-CoV par test d'immunofluorescence sur cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV et/ou par test ELISA indirect en utilisant comme antigène un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV. Les sérums de ces patients sont identifiés par un numéro d'ordre du Centre National de Référence des Virus Influenzae ainsi que par les initiales du patient et le nombre de jours écoulés depuis le début des symptômes. Tous les sérums de cas probables (cf Tableau XVI) reconnaissent les antigènes natifs du SRAS-CoV à l'exception du sérum 032552 du patient VTT, pour lequel l'infection par le SRAS-CoV n'a pas pu être confirmée par

RT-PCR réalisée sur prélèvements respiratoires des jours 3, 8 et 12. Un panel de sérums témoin a été utilisé à titre de contrôle (sérums TV): il s'agit de sérums prélevés en France avant l'épidémie de SRAS survenue en 2003.

5 **Tableau XVI : sérums de cas probables de SRAS**

sérum	patient	jour de prélèvement
033168	JYK	38
033597	JYK	74
032632	NTM	17
032634	THA	15
032541	PHV	10
032542	NIH	17
032552	VTT	8
032633	PTU	16

Des phases solides sensibilisées par le polypeptide recombinant Ssol ont été préparées par adsorption d'une solution de polypeptide Ssol purifié à 4 µg/ml en PBS dans les puits d'une plaque ELISA. Les plaques sont incubées une nuit à 4°C puis lavées avec du tampon PBS-Tween (PBS, 0,1% Tween20). Après lavage en PBS-tween, les sérums à tester (100 µl) sont dilués au 1/100 et 1/400 dans du tampon PBS-lait écrémé-Tween (PBS, 3% lait écrémé, 0,1% Tween) puis ajoutés dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée. Les plaques sont incubées 1h à 37°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween, le conjugué anti-IgG humaines marqué à la peroxidase (réf NA933V, Amersham) dilué au 1/4000 dans du tampon PBS-lait écrémé-Tween est ajouté puis les plaques sont incubées une heure à 37°C. Après 6 lavages avec du tampon PBS-Tween, le chromogène (TMB) et le substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sont ajoutés et les plaques sont incubées 10 minutes à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution 1M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> puis l'absorbance est mesurée à 450 nm avec une référence à 620nm.

Les tests ELISA (figure 38) démontrent que le polypeptide recombinant Ssol est reconnu spécifiquement par les anticorps sériques de patients atteints de SRAS prélevés en phase moyenne ou tardive de l'infection (≥ 10 jours après le début des symptômes), alors qu'il n'est pas reconnu de façon significative par les anticorps sériques des sérums témoins de sujets non atteints de SRAS.

En conclusion, ces résultats démontrent que le polypeptide recombinant Ssol peut être purifié à partir du surnageant de cellules de mammifères infectées par le virus vaccine recombinant VV-TN-Ssol et être utilisé comme antigène pour la mise au point d'un test ELISA de diagnostic sérologique de l'infection par le  
5 SRAS-CoV.

### 5) Applications vaccinales

L'immunogénicité des virus vaccine recombinants a été étudiée chez la souris.

Pour cela, des groupes de 7 souris BALB/c ont été immunisés par  
10 voie i.v. à deux reprises à 4 semaines d'intervalle par  $10^6$  u.f.p. de virus vaccine recombinants VV-TG, VV-TG-S, VV-TG-Ssol, VV-TN, VV-TN-S et VV-TN-Ssol ainsi que, à titre de contrôle, VV-TG-HA qui dirige l'expression de l'hémagglutinine de la souche A/PR/8/34 du virus de la grippe. Les sérums immuns ont été prélevés 3  
semaines après chacune des immunisations (IS1, IS2).

15 Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des groupes par ELISA indirect en utilisant un lysat de cellules VeroE6 infectées par le SRAS-CoV comme antigène et à titre de contrôle, un lysat de cellules VeroE6 non infectées. Les titres (TI) en anticorps anti-SRAS-CoV sont calculés comme l'inverse de la dilution produisant une DO spécifique de 0,5 après révélation par un anticorps  
20 polyclonal anti-IgG(H+L) de souris couplé à la peroxidase (NA931V, Amersham) et du TMB additionné de  $H_2O_2$  (KPL). Cette analyse (figure 39A) montre que l'immunisation par le virus VV-TG-S et VV-TN-S induit chez la souris dès la première immunisation des anticorps dirigés contre la forme native de la protéine de spicule du SRAS-CoV présente dans le lysat de cellules VeroE6 infectées. Les  
25 réponses induites par le virus VV-TN-S sont plus élevées que celles induites par le virus VV-TG-S après la première (TI=740 et TI=270 respectivement) et la deuxième (TI=3230 et TI=600 respectivement) immunisation. Le virus VV-TN-Ssol induit de forts titres d'anticorps anti-SRAS-CoV après deux immunisations (TI=640), alors que le virus VV-TG-Ssol induit une réponse à la limite de la détection (TI=40).

30 Les sérums immuns ont été analysés par pool pour chacun des groupes pour leur capacité à séroneutraliser l'infectivité du SRAS-CoV. 4 points de séroneutralisation sur cellules FRhK-4 (100 TCID<sub>50</sub> de SRAS-CoV) sont réalisés

pour chacune des dilutions de raison 2 testées à partir du 1/20. Le titre séroneutralisant est calculé selon la méthode de Reed et Munsch comme l'inverse de la dilution neutralisant l'infectivité de 2 cupules sur 4. Cette analyse montre que les anticorps induits chez la souris par les virus vaccine exprimant la protéine S ou le polypeptide Ssol sont neutralisants et que les virus à promoteurs synthétiques sont des immunogènes plus efficaces que les virus porteurs du promoteur 7.5K : les titres les plus élevés (640) sont observés après 2 immunisations par le virus VV-TN-S (figure 39B).

Le pouvoir protecteur des anticorps neutralisants induits chez la souris après immunisation par les virus vaccine recombinants est évalué à l'aide d'une infection d'épreuve par le SRAS-CoV.

#### 6) Autres applications

Des virus vaccine recombinants de troisième génération sont construits en substituant les séquences sauvages des gènes S et Ssol par des gènes synthétiques optimisés pour l'expression en cellules de mammifères, décrits ci-dessus. Ces virus vaccine recombinants sont susceptibles d'exprimer des quantités plus importantes des antigènes S et Ssol et donc de présenter une immunogénicité accrue.

Le virus vaccine recombinant VV-TN-Ssol peut être utilisé pour la production en quantité et la purification de l'antigène Ssol en vue d'applications diagnostiques (sérologie par ELISA) et vaccinales (vaccin sous-unitaire).

**Exemple 17 : Virus recombinant de la rougeole exprimant la protéine de spicule (S) du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV). Applications vaccinales.**

#### 1) Introduction

Le vaccin rougeole (MV) induit chez l'homme une immunité protectrice de longue durée après une seule injection (Hilleman, 2002, Vaccine, 20 : 651-665). La protection conférée est très robuste et repose sur l'induction d'une réponse en anticorps et d'une réponse cellulaire CD4 et CD8. Le génome du MV est très stable et aucune réversion vers la virulence des souches vaccinales n'a jamais été observée. Le virus de la rougeole appartient au genre des *Morbillivirus* de la famille des *Paramyxoviridae* ; c'est un virus enveloppé dont le génome est un ARN monocaténaire de polarité négative de 16kb (figure 40A) et dont le cycle de réplication exclusivement cytoplasmique exclut toute possibilité d'intégration dans le

génomique de l'hôte. Le vaccin rougeole est ainsi l'un des vaccins vivants les plus efficaces et les plus sûrs utilisés dans la population humaine. L'équipe de Frédéric Tangy a développé récemment un vecteur d'expression sur la base de la souche Schwarz du virus de la rougeole, qui est la souche atténuée la plus sûre et la plus utilisée chez l'homme comme vaccin contre la rougeole. Cette souche vaccinale peut être isolée à partir d'un clone moléculaire infectieux en conservant son immunogénicité chez les primates ainsi que chez la souris susceptible à l'infection. Elle constitue, après insertion d'unités de transcription supplémentaires, un vecteur pour l'expression de séquences hétérologues (Combredet, 2003, J. Virol. 77 : 11546-11554). En outre, un MV Schwarz recombinant exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du virus West Nile (WNV) induit une réponse en anticorps efficace et de longue durée qui protège la souris d'une infection d'épreuve létale par le WNV (Despres et al, 2004, J. Infect. Dis., sous presse). Toutes ces caractéristiques font de la souche atténuée Schwarz du virus de la rougeole un candidat vecteur extrêmement prometteur pour la construction de nouveaux vaccins vivants recombinants.

Le but de cet exemple est d'évaluer la capacité de virus recombinants de la rougeole (MV) exprimant différents antigènes du coronavirus associé au SRAS (SRAS-CoV) à constituer de nouveaux candidats vaccins contre le SRAS.

Les inventeurs se sont intéressés à la protéine de spicule (S) du SRAS-CoV, qui permet d'induire après immunisation génique chez l'animal des anticorps neutralisants l'infectivité du SRAS-CoV, ainsi qu'à une forme soluble et sécrétée de cette protéine, le polypeptide Ssol, qui est composé de l'ectodomaine (aa 1-1193) de la S fusionné en son extrémité C-ter à une étiquette FLAG (DYKDDDDK) via un linker BspE1 codant pour le dipeptide SG. Ce polypeptide Ssol présente une antigénicité similaire à celle de la protéine S et permet, après injection à la souris sous la forme d'une protéine purifiée adjuvée en hydroxide d'aluminium, l'induction de titres élevés d'anticorps neutralisants contre le SRAS-CoV.

Les différentes formes du gène S ont été introduites sous la forme d'une unité de transcription supplémentaire entre les gènes P (phosphoprotéine) et M (matrice) dans le cADN de la souche Schwarz du MV précédemment décrite (Combredet, 2003, J. Virol. 77 : 11546-11554 ; Demande EP N° 02291551.6 du 20

juin 2002, et Demande EP n° 02291550.8 du 20 juin 2002). Après avoir isolé les virus recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol et vérifié leur capacité à exprimer l'antigène S du SRAS-CoV, leur capacité à induire chez la souris puis chez le singe une réponse immunitaire protectrice contre le SRAS est testée.

## 5 2) Construction des virus recombinants

Le plasmide pTM-MVSchw-ATU2 (figure 40B) contient un cADN infectieux correspondant à l'antigénome de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole (MV) dans lequel une unité de transcription supplémentaire (ATU) a été introduite entre les gènes P (phosphoprotéine) et M (matrice) (Combredet, 2003, 10 Journal of Virology, 77 : 11546-11554). Des génomes recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol du virus de la rougeole ont été construits par l'insertion des ORFs de la protéine S et du polypeptide Ssol au sein de l'unité de transcription supplémentaire du vecteur MVSchw-ATU2.

Pour cela, un fragment d'ADN contenant le cADN de la S du SRAS-CoV a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides 5'-ATACGTACGA 15 CCATGTTTAT TTTCTTATTA TTTCTTACTC TCACT-3' et 5'-ATAGCGCGCT CATTATGTGT AATGTAATTT GACACCCTTG-3' en utilisant le plasmide pcDNA-S comme matrice puis inséré dans le plasmide pCR®2.1-TOPO (Invitrogen) pour obtenir le plasmide pTOPO-S-MV. Les deux oligonucléotides utilisés 20 contiennent des sites de restriction BsiW1 et BssHII, de façon à permettre l'insertion ultérieure dans le vecteur rougeole, et ont été conçus de façon à générer une séquence de 3774 nt incluant les codons d'initiation et de terminaison, afin de respecter la règle des 6 qui stipule que la longueur du génome d'un virus rougeole doit être divisible par 6 (Calain & Roux, 1993, J. Virol., 67 : 4822-4830 ; Schneider et al., 1997, Virology, 25 227 : 314-322). L'insert a été séquencé à l'aide d'un kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) et d'un séquenceur automatique ABI377.

Afin d'exprimer une forme soluble et sécrétée de la S du SRAS-CoV, un plasmide contenant l'ADNc du polypeptide Ssol correspondant à l'ectodomaine (aa 1-1193) de la S du SRAS-CoV fusionné en son extrémité C-ter à la 30 séquence d'une étiquette FLAG (DYKDDDDK) via un linker BspE1 codant pour le dipeptide SG a ensuite été obtenu. Pour cela, un fragment d'ADN a été amplifié à l'aide des oligonucléotides 5'-CCATTTC AAC AATTTGGCCG-3' et 5'-

ATAGGATCCG CGCGCTCATT ATTTATCGTC GTCATCTTTA TAATC-3' à partir du plasmide pCDNA-Ssol puis inséré dans le plasmide pTOPO-S-MV entre les sites SalI et BamHI pour obtenir le plasmide pTOPO-S-MV-SF. La séquence générée est longue de 3618 nt entre les sites BsiW1 et BssHII et respecte la règle des 6.

5 L'insert a été séquencé comme indiqué ci-dessus.

Les fragments BsiW1-BssHII contenant les ADNc de la protéine S et du polypeptide Ssol ont ensuite été excisés par digestion des plasmides pTOPO-S-MV et pTOPO-S-MV-SF puis sous-clonés entre les sites correspondants du plasmide pTM-MVSchw-ATU2 pour donner les plasmides pTM-MVSchw2-SARS-S et pTM-MVSchw2-SARS-Ssol (figure 40B). Ces deux plasmides ont été déposés à la C.N.C.M. le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous les numéros I-3326 et I-3327, respectivement.

Les virus rougeole recombinants correspondants aux plasmides pTM-MVSchw2-SARS-S et pTM-MVSchw2-SARS-Ssol ont été obtenus par génétique inverse selon le système reposant sur l'utilisation d'une lignée cellulaire auxiliaire, décrit par Radecke et coll. (1995, Embo J., 14, : 5773-5784) et modifié par Parks et coll. (1999, J. Virol., 73 : 3560-3566). Brièvement, les cellules auxiliaires 293-3-46 sont transfectées selon la méthode au phosphate de calcium par 5 µg des plasmides pTM-MVSchw2-SARS-S ou pTM-MVSchw2-SARS-Ssol et 0,02 µg du plasmide pEMC-La dirigeant l'expression de la polymérase L du MV (don de M.A. Billeter). Après une nuit d'incubation à 37°C, un choc thermique est réalisé pendant 2 heures à 43°C et les cellules transfectées sont transférées sur une monocouche de cellules Vero. Pour chacun des deux plasmides, des syncytia sont apparus après 2 à 3 jours de co-culture et ont été transférés successivement sur des monocouches de cellules Vero à 70% de confluence en boîtes de pétri de 35 mm puis en flacons de 25 et 75 cm<sup>2</sup>. Quand les syncytia ont atteint 80-90% de confluence, les cellules sont récupérées à l'aide d'un grattoir puis congelées et décongelées une fois. Après une centrifugation à basse vitesse, le surnageant contenant le virus est conservé en aliquot à -80°C. Les titres des virus recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol ont été déterminés par dilution limite sur cellules Vero et le titre en dose infectant 50% des cupules (TCID<sub>50</sub>) calculé selon la méthode de Kärber.

### 3) Caractérisation des virus recombinants

L'expression des transgènes codant la protéine S et le polypeptide Ssol a été recherchée par western blot et immunofluorescence.

Des monocouches de cellules Vero en flacons T-25 ont été infectées à une multiplicité de 0,05 par différents passages des deux virus MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol et le virus sauvage MWSchw à titre de contrôle. Quand les syncytia ont atteint 80 à 90% de confluence, des extraits cytoplasmiques ont été préparés dans un tampon d'extraction (150mMNaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 1% triton-X-100, 0,1% SDS, 1% DOC) puis dilués en tampon de dépôt selon Laemmli, séparés sur un gel SDS à 8% de polyacrylamide et transférés sur une membrane de PVDF (BioRad). La détection de cette immunoempreinte (« western blot ») a été réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-S (immun-sérum du lapin P11135 : cf exemple 4 ci-dessus) et d'anticorps polyclonaux d'âne dirigés contre les IgG de lapin et couplés à la peroxidase (NA934V, Amersham). Les anticorps fixés ont été révélés par luminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham) et de films d'autoradiographie Hyperfilm MP (Amersham).

Des cellules Vero en monocouches sur lamelles de verre ont été infectées par les deux virus MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol et le virus sauvage MWSchw à titre de contrôle à des multiplicités d'infection de 0,05. Quand les syncytia ont atteint 90 à 100% (virus MVSchw2-SARS-Ssol) ou 30 à 40% (MVSchw2-SARS-S, MWSchw) de confluence, les cellules ont été fixées dans une solution de PBS-PFA 4%, perméabilisées par une solution de PBS contenant 0,2% de triton puis marquées par des anticorps polyclonaux de lapins hyperimmunisés par des virions purifiés et inactivés du SRAS-CoV et par un conjugué d'anticorps de chèvre anti-IgG(H+L) de lapin couplé au FITC (Jackson).

Comme le montrent les figures 41 et 42, les virus recombinants MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol dirigent l'expression de la protéine S et du polypeptide Ssol respectivement à des niveaux comparables à ceux que l'on peut observer 8h après infection par le SRAS-CoV. L'expression de ces polypeptides est stable après 3 passages des virus recombinants en culture cellulaire. Ces résultats démontrent que les virus rougeole recombinants sont bien porteurs des transgènes et permettent l'expression de la glycoprotéine du SRAS sous sa forme membranaire (S)



ou sous une forme soluble (Ssol). On s'attend à ce que le polypeptide Ssol soit sécrété des cellules infectées par le virus MVSchw2-SARS-Ssol comme c'est le cas lorsque ce même polypeptide est exprimé dans des cellules de mammifères après transfection transitoire des séquences correspondantes (cf exemple 11 ci-dessus).

#### 5 4) Applications

Ayant montré que les virus MVSchw2-SARS-S et MVSchw2-SARS-Ssol permettent l'expression de la S du SRAS-CoV, leur capacité à induire une réponse immunitaire protectrice contre le SRAS-CoV chez la souris CD46<sup>+/-</sup> IFN- $\alpha\beta$ R<sup>-/-</sup>, qui est susceptible à l'infection par le MV, est évaluée. La réponse en anticorps des souris immunisées est évaluée par test ELISA contre les antigènes natifs du SRAS-CoV et pour leur capacité à neutraliser l'infectivité du SRAS-CoV *in vitro*, en utilisant les méthodologies décrites ci-dessus. Le pouvoir protecteur de la réponse sera évalué en mesurant la réduction de la charge virale pulmonaire 2 jours après une infection d'épreuve non létale par le SRAS-CoV.

Des virus rougeole recombinants de seconde génération sont construits en substituant les séquences sauvages des gènes S et Sol par des gènes synthétiques optimisés pour l'expression en cellules de mammifères, décrits à l'exemple 15 ci-dessus. Ces virus rougeole recombinants sont susceptibles d'exprimer des quantités plus importantes des antigènes S et Ssol et donc de présenter une immunogénicité accrue.

Alternativement, les gènes sauvages ou synthétiques codant pour la protéine S ou le polypeptide Ssol peuvent être insérés dans le vecteur rougeole MVSchw-ATU3 sous la forme d'une unité de transcription supplémentaire localisée entre les gènes H et L, puis les virus recombinants produits et caractérisés de façon similaire. Cette insertion est susceptible de générer des virus recombinants possédant des caractéristiques (multiplication du virus, niveau d'expression du transgène) différentes et possiblement une immunogénicité améliorée par rapport à ceux obtenus après insertion des transgènes entre les gènes P et N.

Le virus rougeole recombinant MVSchw2-SARS-Ssol peut être utilisé pour la production en quantité et la purification de l'antigène Ssol en vue d'applications diagnostiques et vaccinales.

**Exemple 18 : Autres applications liées à la protéine S**

5 a) Les vecteurs lentiviraux permettant l'expression de la S ou de Ssol (voire de fragments de la S) peuvent constituer un vaccin recombinant contre le SRAS-CoV, pour être utilisé en prophylaxie humaine et vétérinaire. Afin de démontrer la faisabilité d'un tel vaccin, l'immunogénicité des vecteurs lentiviraux recombinants TRIP-SD/SA-S-WPRE et TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE est étudiée chez la souris.

10 b) Des anticorps monoclonaux sont produits à l'aide du polypeptide recombinant Ssol. D'après les résultats présentés à l'exemple 14 ci-dessus, ces anticorps ou du moins la majorité d'entre eux reconnaîtront la forme native de la S du SRAS-CoV et seront susceptibles d'applications diagnostiques et/ou prophylactiques.

c) Un test de sérologie du SRAS est mis au point avec le polypeptide Ssol utilisé comme antigène et la méthodologie du double épitope.

### REVENDICATIONS

1°) Protéine ou polypeptide isolé et purifié, caractérisé en ce qu'il s'agit de la protéine S de séquence SEQ ID NO :3, de son ectodomaine, ou d'un  
5 fragment de son ectodomaine.

2°) Protéine ou polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué des acides aminés correspondant aux positions 1 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S.

3°) Protéine ou polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en  
10 ce qu'il est constitué des acides aminés correspondant aux positions 14 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S.

4°) Protéine ou polypeptide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué des acides aminés correspondant aux positions 475 à 1193 de la séquence en acides aminés de la protéine S.

5°) Acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide  
15 selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

6°) Acide nucléique selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence codante SEQ ID NO: 5 ou la séquence codante SEQ ID NO:6.

7°) Vecteur d'expression recombinant, caractérisé en ce qu'il code  
20 pour une protéine ou un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

8°) Vecteur d'expression recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les vecteurs contenus dans les souches bactériennes suivantes, déposées auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 :

- 25 a) souche n° I- 3118, déposée le 23 octobre 2003,  
b) souche n° I- 3019, déposée le 12 mai 2003,  
c) souche n° I- 3020, déposée le 12 mai 2003,  
d) souche n° I-3059, déposée le 20 juin 2003,  
e) souche n° I-3323, déposée le 22 novembre 2004,  
30 f) souche n° I-3324, déposée le 22 novembre 2004,  
g) souche n° I-3326, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,  
h) souche n° I-3327, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,

- 5 i) souche n° I-3332, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,  
j) souche n° I-3333, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004  
k) souche n° I-3334, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,  
l) souche n° I-3335, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,  
m) souche n° I-3336, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,  
n) souche n° I-3337, déposée le 1<sup>er</sup> décembre 2004,  
o) souche n° I-3338, déposée le 2 décembre 2004,  
p) souche n° I-3339, déposée le 2 décembre 2004,  
q) souche n° I-3340, déposée le 2 décembre 2004, et  
10 r) souche n° I-3341, déposée le 2 décembre 2004.

9°) Acide nucléique comportant un gène synthétique permettant une expression optimisée de la protéine S dans des cellules eucaryotes, caractérisé en ce qu'il possède la séquence SEQ ID NO: 140

15 10°) Vecteur d'expression comportant un acide nucléique selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est contenu dans la souche bactérienne déposée à la CNCM, le 1<sup>er</sup> décembre 2004, sous le n°I-3333.

11°) Vecteur d'expression selon la revendication 7 ou la revendication 9, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral, sous forme de particule virale ou sous forme de génome recombinant.

20 12°) Vecteur selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une particule virale recombinante ou d'un génome viral recombinant susceptible d'être obtenu par transfection d'un plasmide selon les alinéas g), h) ou k) à r) de la revendication 8, dans un système cellulaire approprié.

25 13°) Vecteur lentiviral codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

14°) Virus rougeole recombinant codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

15°) Virus vaccine recombinant codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

30 16°) Utilisation d'un vecteur selon les alinéas d) à p) de la revendication 8, ou d'un vecteur selon la revendication 10, pour la production, en

système eucaryote, de la protéine S du coronavirus associé au SRAS, ou d'un fragment de cette protéine.

17°) Méthode de production de la protéine S en système eucaryote, comportant une étape de transfection de cellules eucaryotes en culture par un vecteur  
5 choisi parmi les vecteurs contenus dans les souches bactériennes mentionnées aux alinéas d) à p) de la revendication 8, ou à la revendication 10.

18°) Cellule eucaryote génétiquement modifiée exprimant une protéine ou un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

19°) Cellule selon la revendication 18, susceptible d'être obtenue par  
10 transfection par l'un quelconque des vecteurs mentionnés aux alinéas k) à n) de la revendication 8.

20°) Cellule selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'il s'agit de la cellule FRhK4-Ssol-30, déposée à la CNCM le 22 novembre 2004, sous le n°I-3325.

21°) Anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine S native d'un  
15 coronavirus associé au SRAS.

22°) Utilisation d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou d'un anticorps selon la revendication 21, pour détecter une infection par un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon  
20 biologique.

23°) Méthode de détection d'un coronavirus associé au SRAS, à partir d'un échantillon biologique, caractérisée en ce que la détection est effectuée par ELISA utilisant la protéine S recombinante ou son ectodomaine, ou un fragment de son ectodomaine, exprimée dans un système eucaryote.

24°) Méthode de détection selon la revendication 23, comportant en  
25 outre une étape de détection par ELISA utilisant la protéine N recombinante.

25°) Méthode selon la revendication 23 ou 24, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une méthode par ELISA double épitope, et en ce que le sérum à tester est mélangé à l'antigène de révélation, ledit mélange étant ensuite mis au contact de  
30 l'antigène fixé sur un support solide.

26°) Complexe immunitaire formé d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps monoclonal selon la revendication 21, et d'une protéine ou d'un peptide du coronavirus associé au SRAS.

27°) Complexe immunitaire formé d'une protéine ou d'un polypeptide  
5 selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, et d'un anticorps dirigé spécifiquement contre un épitope du coronavirus associé au SRAS.

28°) Kit ou coffret de détection d'un coronavirus associé au SRAS, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif sélectionné dans le groupe constitué par : une protéine ou polypeptide selon l'une quelconque des revendications  
10 1 à 4, un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 5, ou 6, une cellule selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, ou un anticorps selon la revendication 21.

29°) Composition immunogène et/ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide ou une protéine recombinante selon l'une quelconque  
15 des revendications 1 à 4, obtenu dans un système d'expression eucaryote.

30°) Composition immunogène et/ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur ou virus recombinant selon l'une quelconque des revendications 7, 8, et 10 à 15.

31°) Insérat d'acide nucléique d'origine virale, caractérisé en ce  
20 qu'il est contenu dans l'une quelconque des souches mentionnées aux alinéas a) à h) et k) à r) de la revendication 8.

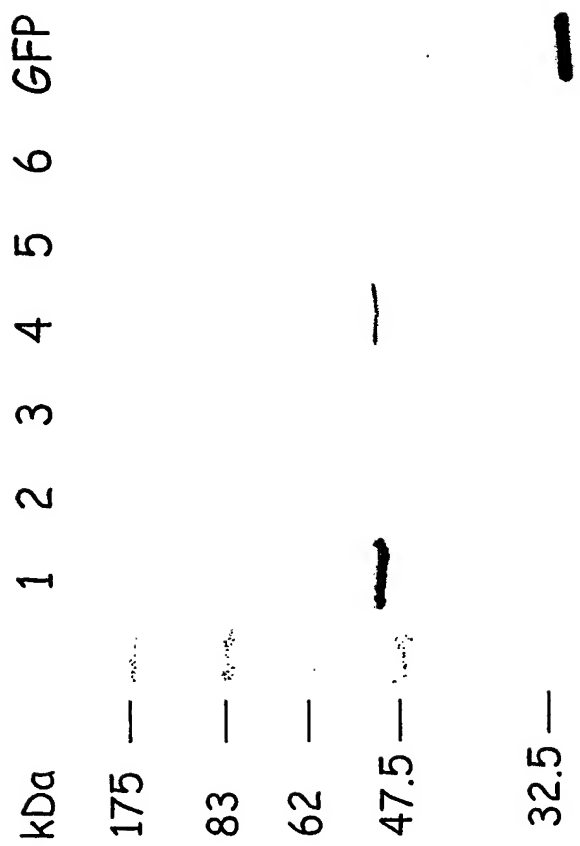


FIGURE 1

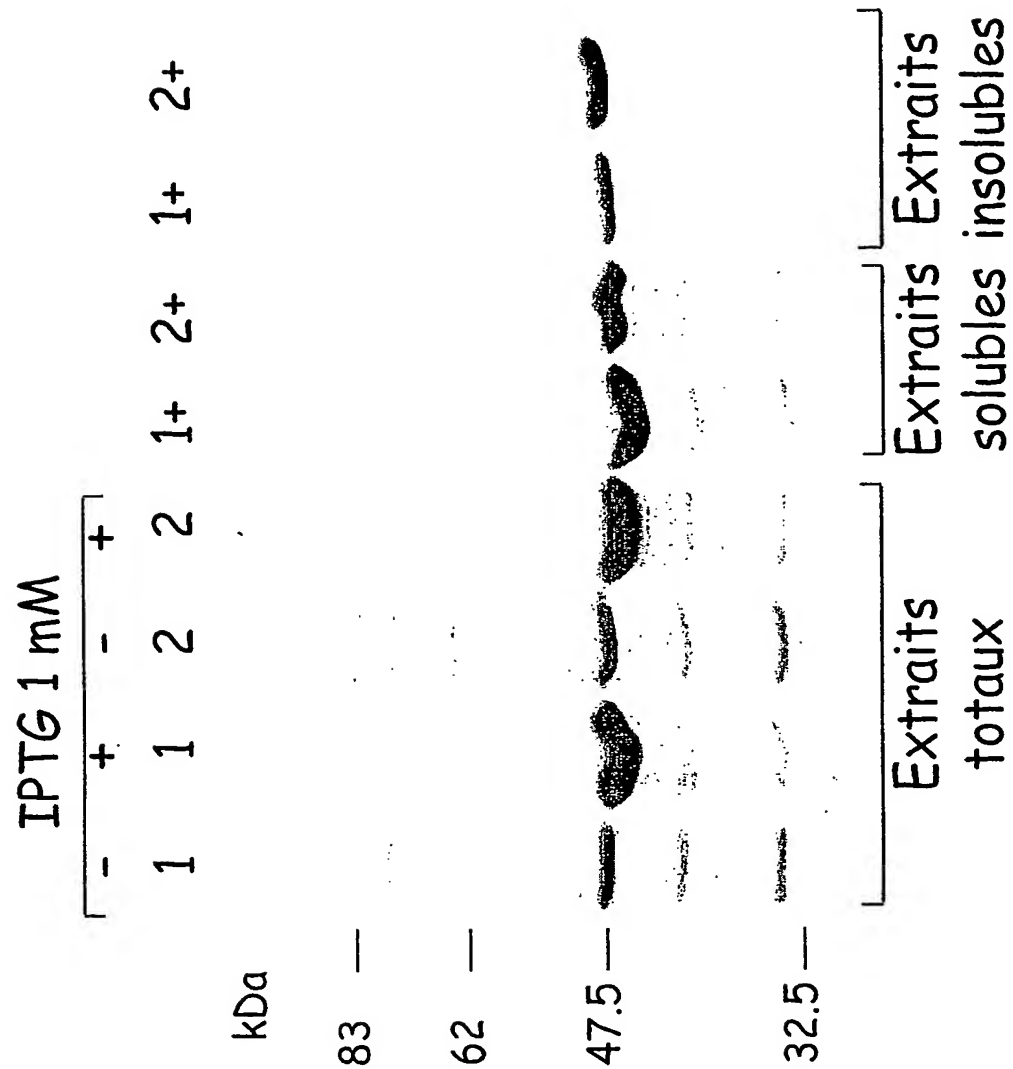


FIGURE 2



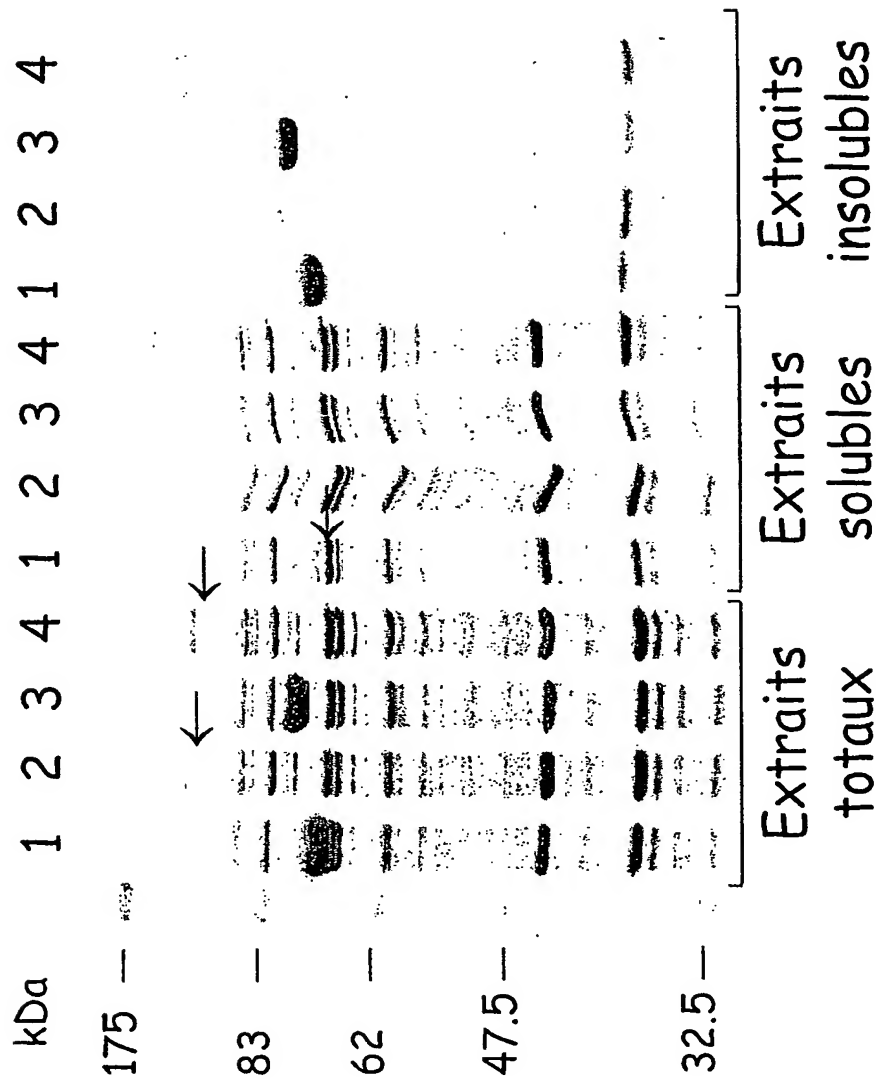


FIGURE 3

4/116

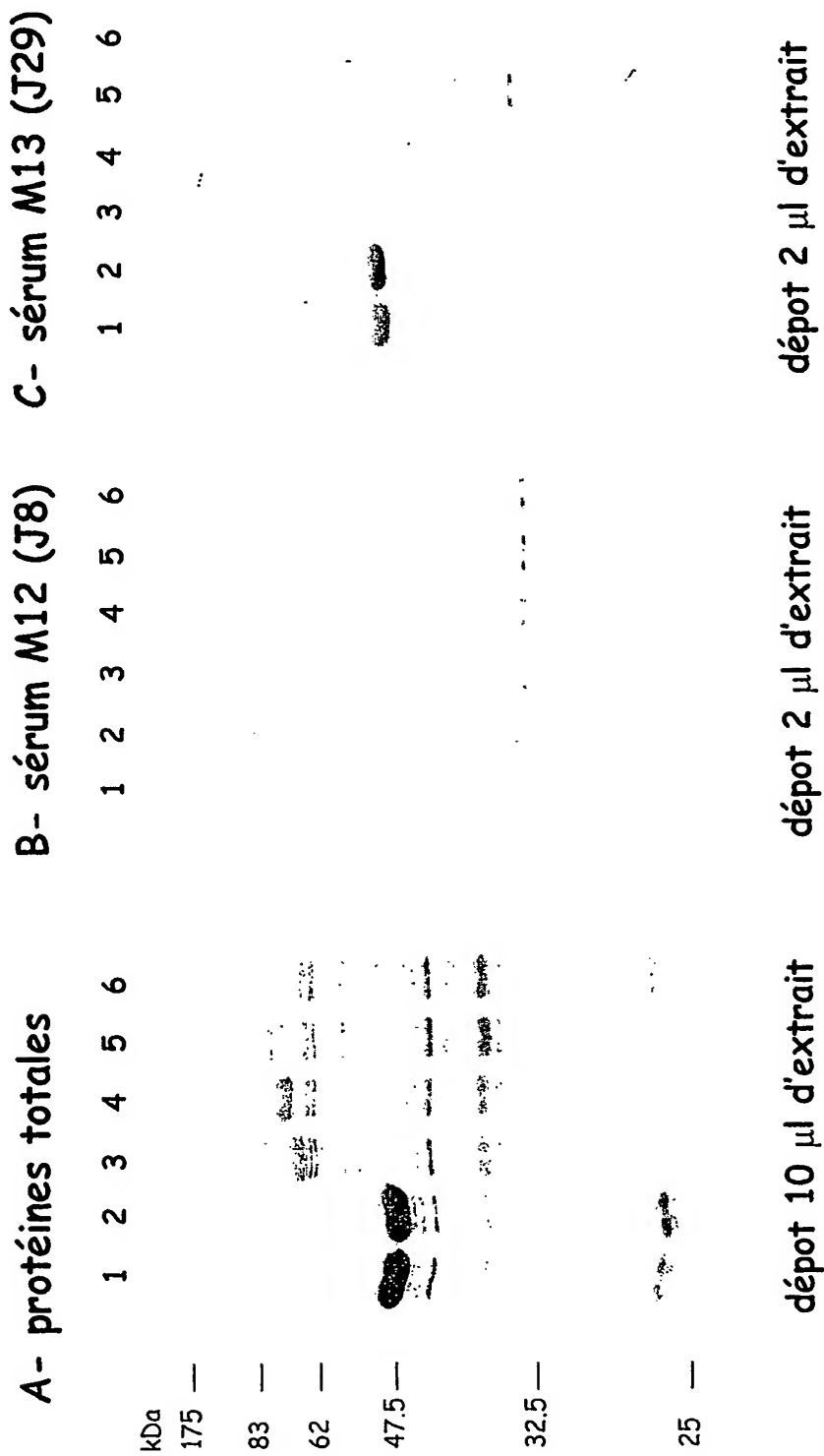


FIGURE 4

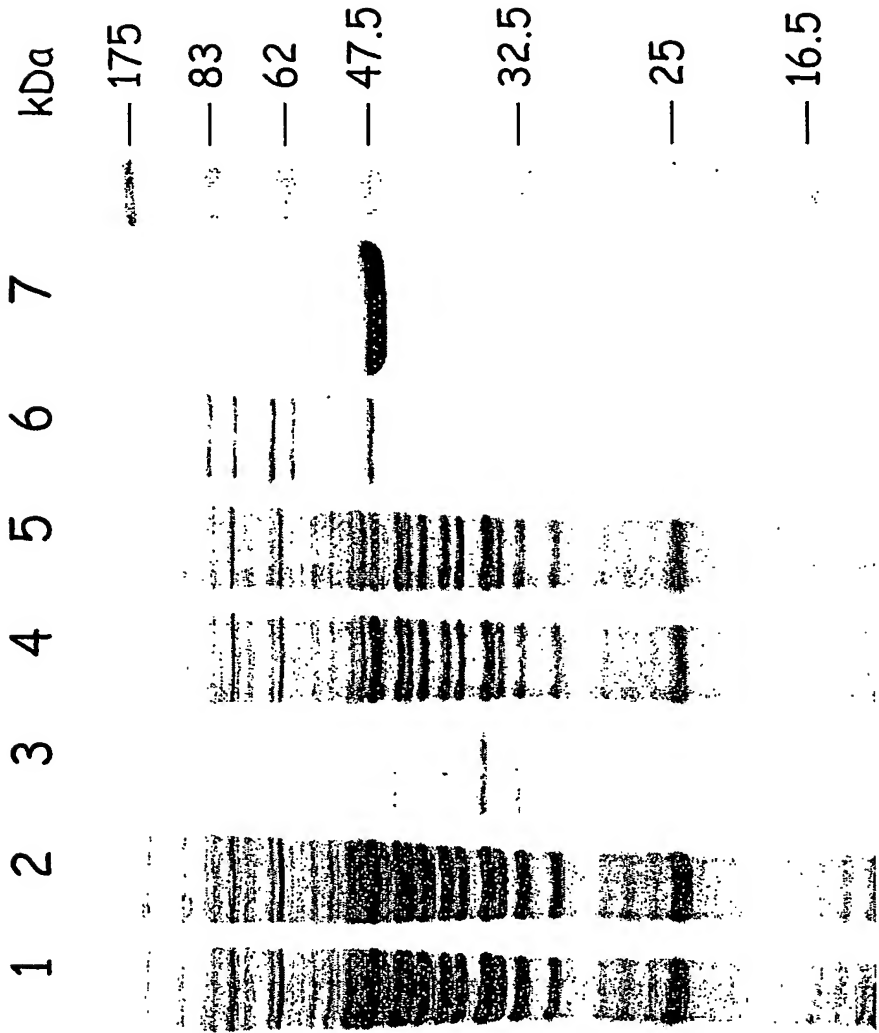


FIGURE 5

6/116

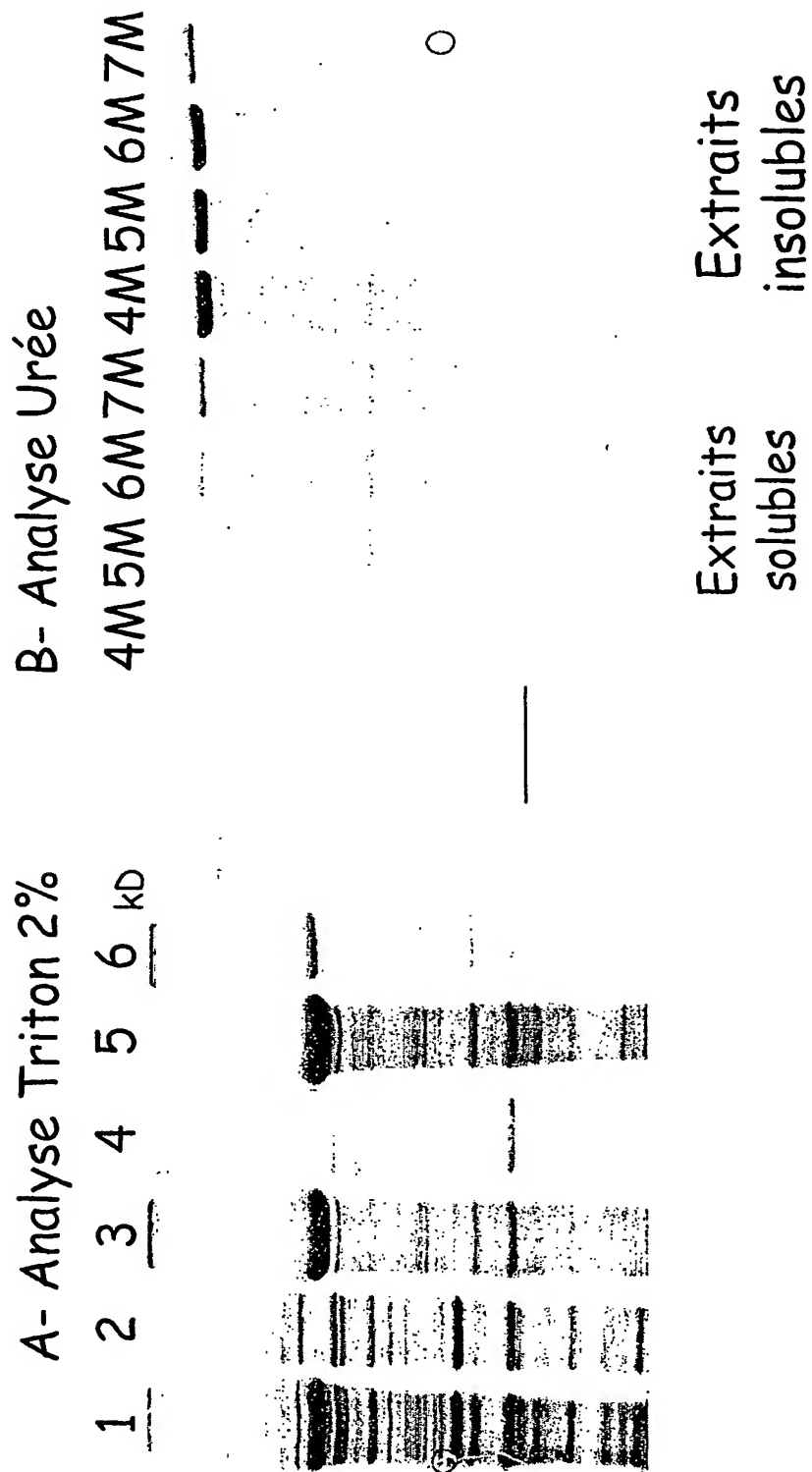


FIGURE 6

7/116

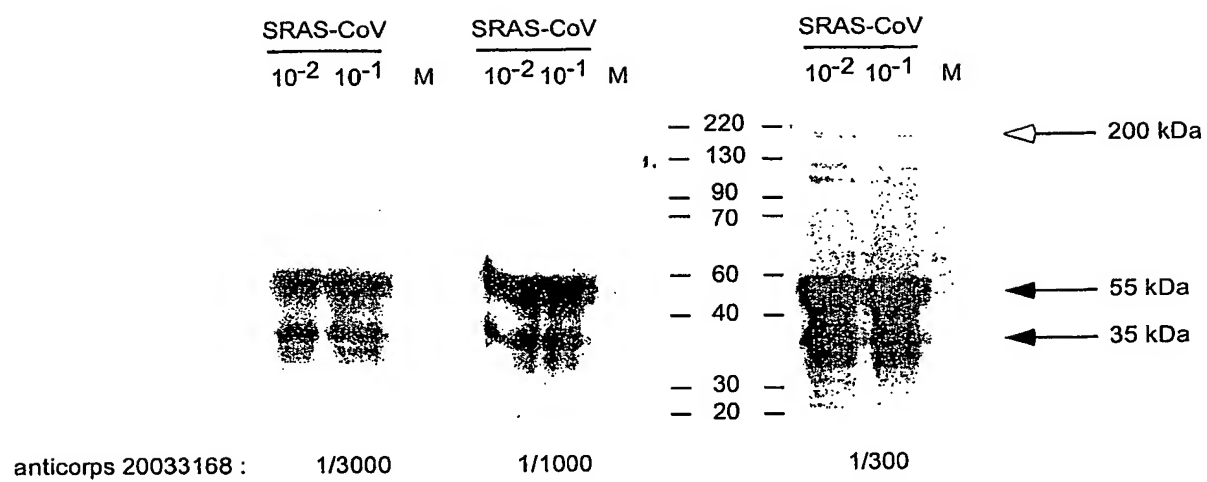
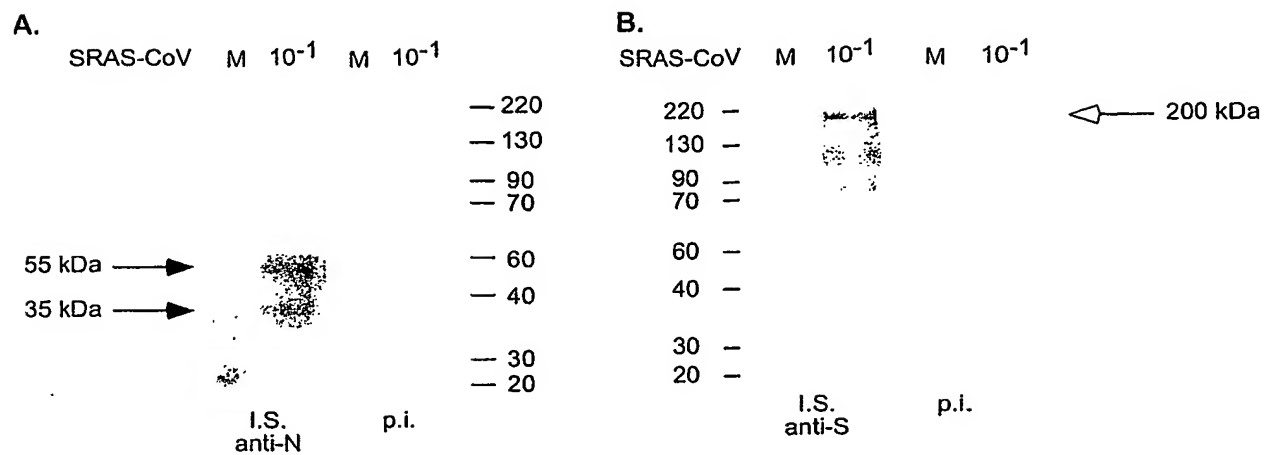


FIGURE 7

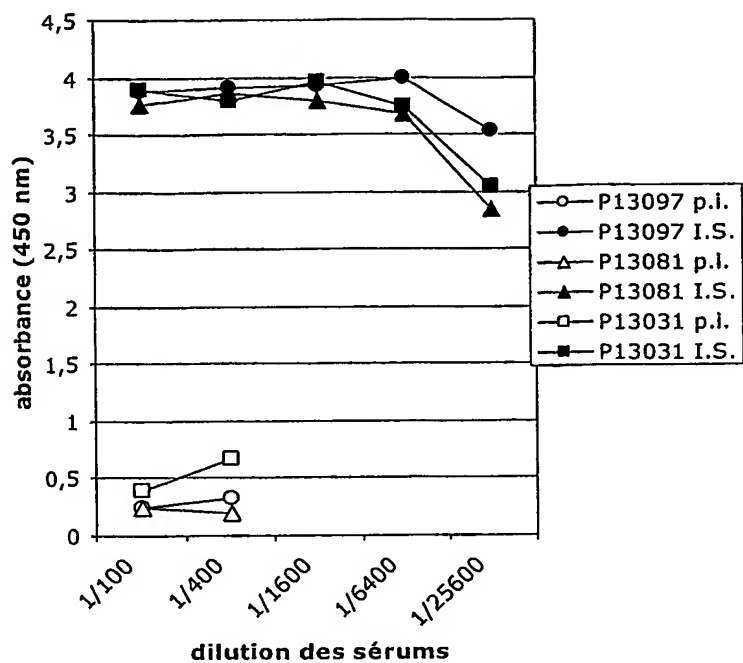
8/116



**FIGURE 8**

9/116

A



B

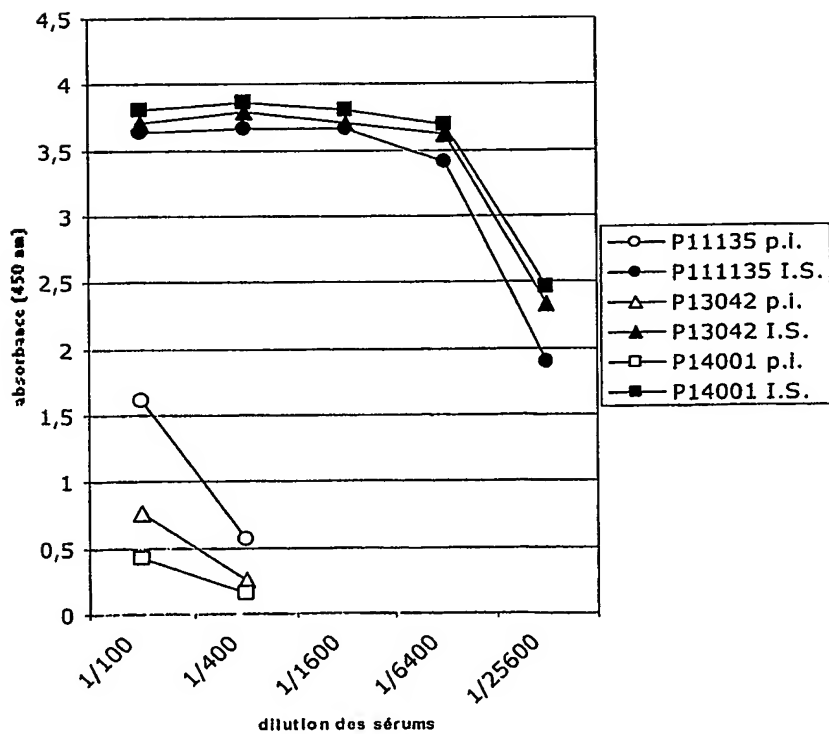


FIGURE 9

10/116

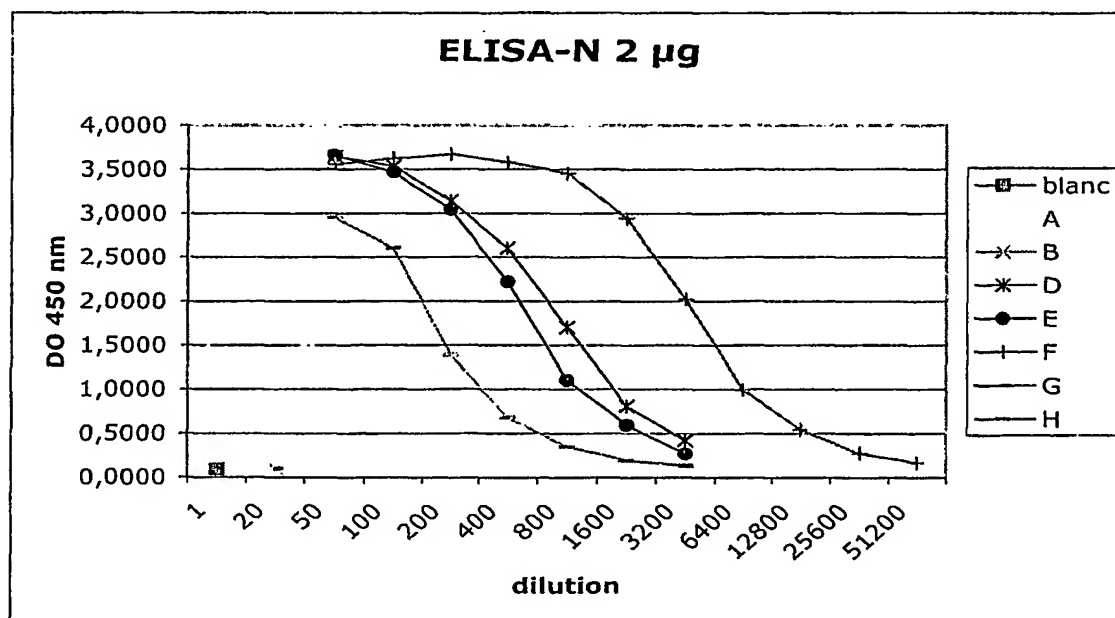
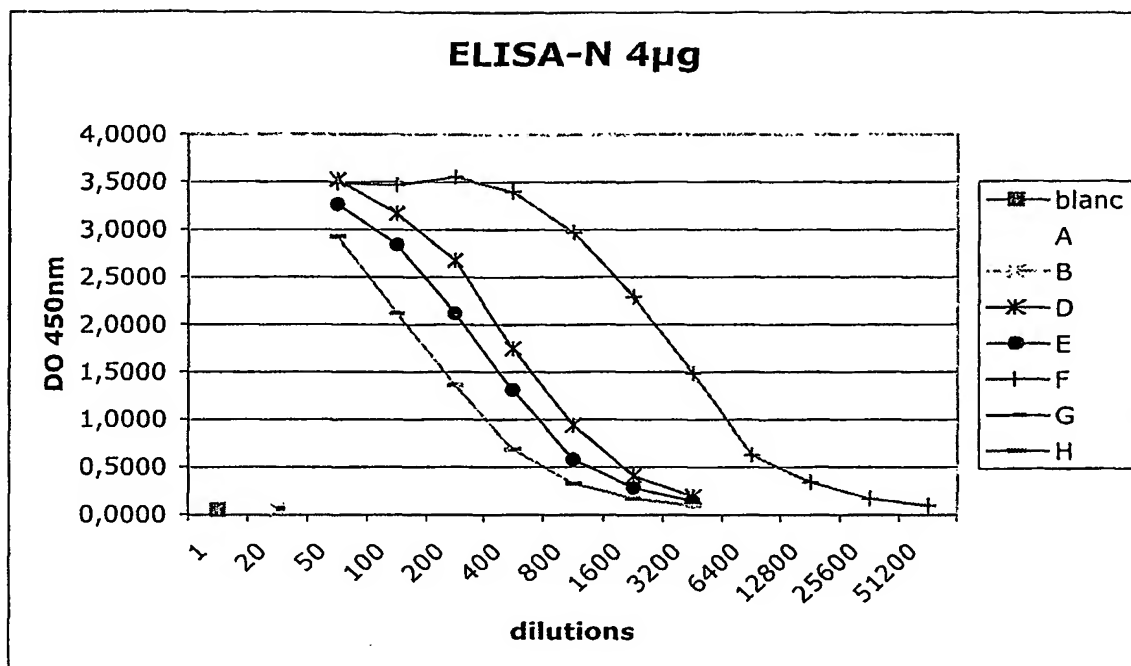


FIGURE 10a



11/116

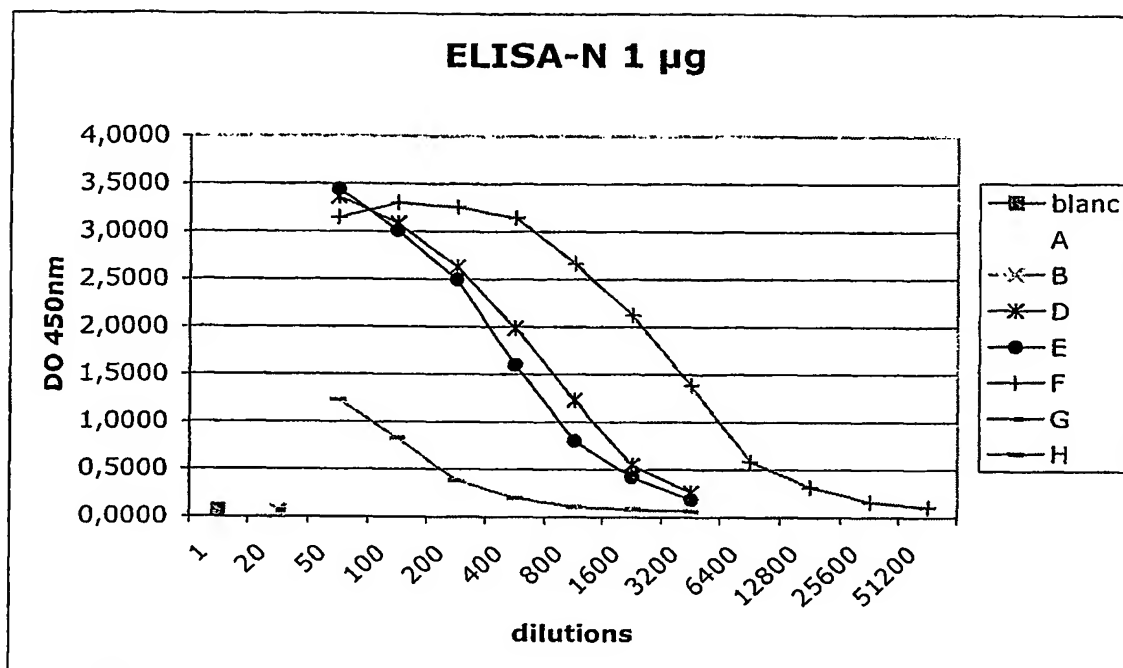


FIGURE 10b

12/116

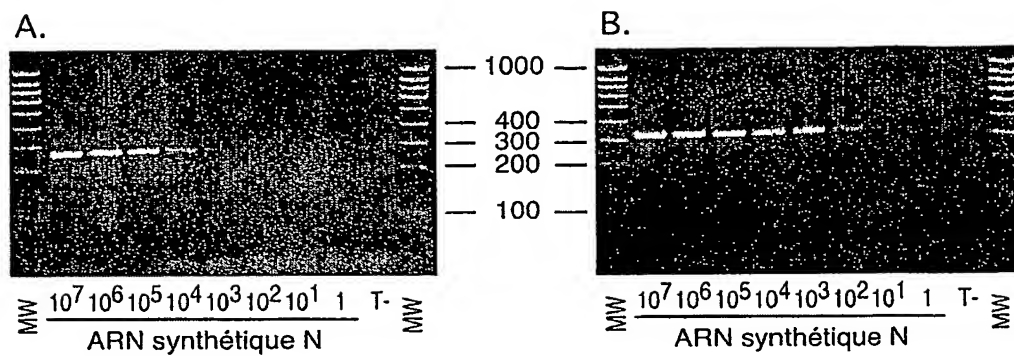
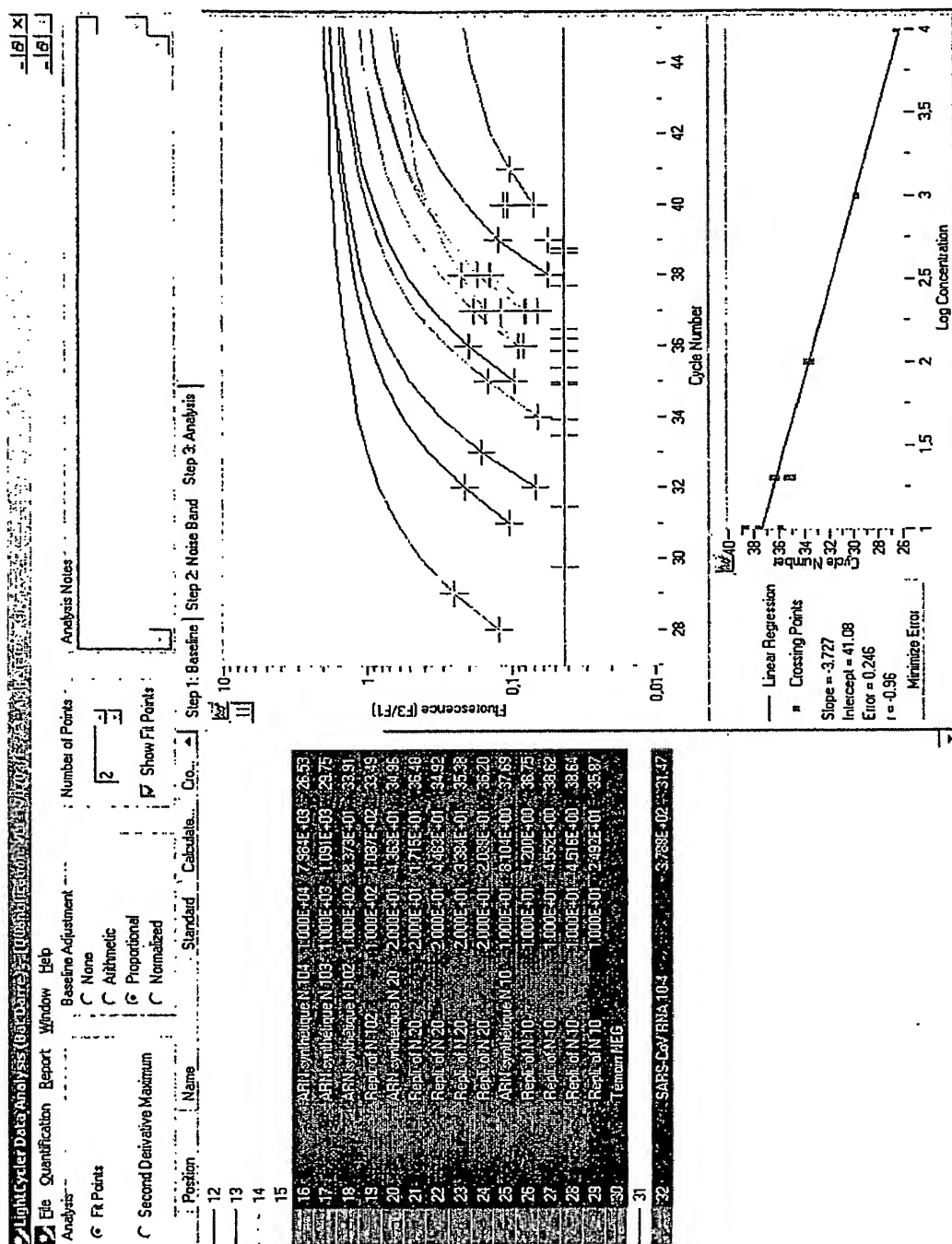


FIGURE 11



**FIGURE 12**

>< XhoII  
 >< Sau3AI  
 >< TthHB8I >< NdeII  
 >< TaqI >< MflI  
 >< Sau3AI >< MboI  
 >< NdeII >< DpnII  
 >< MboI>< MnlI>< DpnI  
 >< DpnII >< BstYI  
 >< DpnI >< BspAI  
 >< BspAI >< Bsp143I  
 >< Bsp143I>< BglII  
 >< VneI  
 >< SphI  
 >< SnoI  
 >< RmaI  
 >< PaeI >< SduI  
 >< NspI >< NspII  
 >< NspHI >< HgiAI  
 >< NlaIII >< Bsp1286I  
 >< MaeI >< BmyI  
 >< ApaLI  
 >< Alw44I  
 >< Alw21I  
 >< SfcI  
 >< PstI  
 >< MnlI  
 >< Ksp632I  
 >< EarI  
 >< Eam1104I  
 >< HindII >< MboII  
 >< HincII >< MaeIII  
 >< TthHB8I >< StyI  
 >< TaqI >< RmaI >< ScrFI  
 >< Sau3AI >< MaeI >< NciI  
 >< NdeII >< EcoT14I >< MspI  
 >< MboI >< Eco130I >< MaeIII  
 >< DpnII >< BssT1I >< HpaII  
 >< DpnI >< BsaJI >< HapII  
 >< BspAI >< BlnI >< DsaV  
 >< Bsp143I >< AvrII >< BcnI  
 >< HindII >< MaeII> < Eco57I >< Esp3I >< RmaI  
 >< HincII > < AflIII > < DdeI >< BsmAI >< MaeII  
 >< BsmBI  
 >< Alw26I >< BsmBI  
 >< BsmBI

ATATTAGGTT TTTACCTACC CAGGAAAAGC CAACCAACCT CGATCTCTTG TAGATCTGTT CTCTAAACGA  
 10 20 30 40 50 60 70  
 ACTTTAAAT CTGTGTAGCT GTCGCTCGGC TGCATGCCTA GTGCACCTAC GCAGTATAAA CAATAATAAA  
 80 90 100 110 120 130 140  
 TTTTACTGTC GTTGACAAGA AACGAGTAAC TCGTCCCTCT TCTGCAGACT GCTTACGGTT TCGTCCGTGT  
 150 160 170 180 190 200 210  
 TGCAGTCGAT CATCAGCATA CCTAGGTTTC GTCCGGGTGT GACCGAAAGG TAAGATGGAG AGCCTTGTTTC  
 220 230 240 250 260 270 280  
 TTGGTGTCAA CGAGAAAACA CACGTCCAAC TCAGTTTGCC TGTCTTCACG GTTAGAGACG TGCTAGTGCC  
 290 300 310 320 330 340 350

FIGURE 13.1

15/116

```

    >< Sau96I
      >< PssI
    >< Pali
    >< NspIV
      >< MnlI
      >< HaeIII
    >< EcoO109I
      >< DraII>< MboII >< PmlI
    >< MnlI >< Cfr13I >< PmaCI
    >< Ksp632I >< BsuRI > < MaeII
    >< HinfI >< BsiZI>< EcoNI >< Eco72I
      >< EarI >< BshI >< BslI >< BsaAI
    >< PleI >< Eam1104I>< AsuI >< BsiYI>< BbrPI >< MnlI
TGGCTTCGGG GACTCTGTGG AAGAGGCCCT ATCGGAGGCA CGTGAACACC TCAAAAATGG CACTTGTGGT
    360      370      380      390      400      410      420

                                >< Tru9I
                                >< SfaNI
    >< RmaI >< RsaI >< Csp6I >< BspWI >< MseI
    >< MaeI >< AluI >< AfaI >< AluI > < MaeII
CTAGTAGAGC TGGAAAAAGG CGTACTGCCC CAGCTTGAAC AGCCCTATGT GTTCATTAAA CGTTCTGATG
    430      440      450      460      470      480      490

      >< Pali
      >< HaeIII
    >< Tru9I >< GdiII >< RsaI
    >< MseI >< EaeI >< McrI ><
    >< Esp4I >< BsuRI >< BsmI BsiEI ><
    >< AflII >< BshI >< AluI >< BscCI >< AfaI
CCTTAAGCAC CAATCACGGC CACAAGGTCG TTGAGCTGGT TGCAGAAATG GACGGCATTC AGTACGGTCG
    500      510      520      530      540      550      560

                                >< NspI
                                >< ScaI >< NspHI
                                >< RsaI >< NlaIII
                                > < Csp6I >< BslI >< MboII
    >< BsrI >< BsiYI >< MboII
    >< AciI >< AfaI >< AflIII >< MunI >< AciI
TAGCGGTATA AACTGGGAG TACTCGTGCC ACATGTGGGC GAAACCCCAA TTGCATACCG CAATGTTCTT
    570      580      590      600      610      620      630

                                >< TthHB8I
                                >< TaqI
                                >< Sau3AI
                                >< NdeII
                                >< MboI
                                >< DpnII
                                > < DpnI
                                >< ClaI
                                >< Bsu15I
                                >< BspDI
                                >< BspAI
                                > < Bsp143I
                                >< Bsp106I
                                >< BsiXI >< MaeIII >
                                >< BscI>< SfaNI DdeI ><
                                >< BanIII BfrI ><
CTTCGTAAGA ACGGTAATAA GGGAGCCGGT GGTCATAGCT ATGGCATCGA TCTAAAGTCT TATGACTTAG
    640      650      660      670      680      690      700

```

FIGURE 13.2

[illegible]

FIGURE 13.3

17/116

```

>< MvaI      >< Hin6I      >< SduI      >< Csp45I
>< Ecl136I   >< HhaI      >< NspII     >< BstBI
>< BstOI     >< HaeII     >< HgiAI     >< Bsp119I
>< BstNI     >< Eco47III   >< Bsp1286I  >< BsiCI
>< BsiLI     >< CfoI      >< BmyI      >< Bpu14I
>< ApyI >< DdeI >< Bsp143II >< AluI   >< Alw21I   >< AsuII
CTGGTTCACCT GAGCGCTCTG ATAAGAGCTA CGAGCACCAG ACACCCTTCG AAATTAAGAG TGCCAAGAAA
      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050

                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< BsmI
                                >< BscCI
                                >< MnlI
TTTGACACTT TCAAAGGGGA ATGCCCAAAG TTTGTGTTTC CTCTTAACTC AAAAGTCAAA GTCATTCAAC
      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120

>< PmlI
>< PmaCI
>< MaeII
>< Eco72I
>< BsaAI      >< NlaIII      >< RsaI
>< BbrPI      >< Bst1107I >< Csp6I
>< AflIII     >< MnlI>< DdeI     >< AccI      >< AfaI
CACGTGTTGA AAAGAAAAAG ACTGAGGGTT TCATGGGGCG TATACGCTCT GTGTACCCTG TTGCATCTCC
      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190

>< SfaNI
>< MaeIII     >< AccI      NlaIII ><
ACAGGAGTGT AACAAATATGC ACTTGCTTAC CTTGATGAAA TGTAATCATT GCGATGAAG TTCATGGCAG
      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260

                                >< SinI
                                >< Sau96I
                                PssI ><
                                >< Psp5II
                                >< PpuMI
                                >< NspIV
                                >< NspHII
                                >< Eco47I
                                >< DraII
                                >< Cfr13I
                                >< BsiZI
                                >< Bme18I
                                >< AvaII
                                >< AsuI
                                EcoO109I ><AflIII >
>< MaeII     ACGTGCGACT TTCTGAAAGC CACTTGTGAA CATTGTGGCA CTGAAAATTT AGTTATTGAA GGACCTACTA
      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330

                                Van91I ><
                                SinI ><
                                Sau96I ><
                                PflMI ><
                                NspIV ><
                                NspHII >
                                Eco47I ><
                                Cfr13I ><
                                BslI ><
                                BsiZI ><
                                BsiYI ><
                                Bme18I ><
                                AvaII ><
                                AsuI ><

>< RsaI
>< NspI
>< NlaIV
>< NlaIII
>< NspHI>< KpnI
>< Eco64I
>< Csp6I
>< BscBI
>< BanI
>< Asp718
>< AfaI
>< AccB1I

```

FIGURE 13. 4

18/116

```

    >< Acc65I          >< SfcI          >< NlaIII          AccB7I ><
CATGTGGGTA CCTACCTACT AATGCTGTAG TGAAAATGCC ATGTCCTGCC TGTCAAGACC CAGAGATTGG
  1340          1350          1360          1370          1380          1390          1400

                                >< TthHB8I
                                >< TaqI>< MnlI
                                >< HinfI

    >< DdeI          >< PleI          >< AciI
ACCTGAGCAT AGTGTTCGAG ATTATCACAA CCACTCAAAC ATTGAACTC GACTCCGCAA GGGAGGTAGG
  1410          1420          1430          1440          1450          1460          1470

    >< RmaI          NlaIV ><
    >< MnlI          >< BsrI
    >< MaeI          >< BbvI          >< Fnu4HI          BscBI ><
ACTAGATGTT TTGGAGGCTG TGTGTTTGCC TATGTTGGCT GCTATAATAA GCGTGCCTAC TGGGTTCCTC
  1480          1490          1500          1510          1520          1530          1540

                                XhoII ><
                                Sau3AI ><
                                NdeII ><
                                MflI ><
                                MboI ><
                                >< MaeIII
                                >< Eco31I          DpnII ><
                                >< PalI          >< HaeIII          >< BsrI          >< MnlI DpnI >
                                >< BsuRI          >< BsmAI          BstYI ><
    >< RmaI          >< MnlI          > < DdeI          >< BspWI          >< BsaI>< HphI          BspAI ><
    >< MaeI          >< BshI>< BglI          >< Alw26I          Bsp143I >
GTGCTAGTGC TGATATTGGC TCAGGCCATA CTGGCATTAC TGGTGACAAT GTGGAGACCT TGAATGAGGA
  1550          1560          1570          1580          1590          1600          1610

                                > < Tru9I
                                > < MseI
                                >< MaeII          >< Tru9I
                                >< HpaI
                                >< HindII
                                > < MnlI
                                > < Ksp632I
                                >< HinfI >< PleI >< HincII
                                > < EarI
    >< AlwI          >< DdeI          >< AflIII          >< MseI          > < Eam1104I
TCTCCTTGAG ATACTGAGTC GTGAACGTGT TAACATTAAC ATTGTTGGCG ATTTTCATTT GAATGAAGAG
  1620          1630          1640          1650          1660          1670          1680

    >< MboII          PleI ><
    >< BstXI          >< SfaNI          > < HinfI
GTTGCCATCA TTTTGGCATC TTTCTCTGCT TCTACAAGTG CCTTTATTGA CACTATAAAG AGTCTTGATT
  1690          1700          1710          1720          1730          1740          1750

                                >< StyI
                                >< MaeIII
                                >< EcoT14I
                                >< Eco130I
                                >< PleI          >< BssT1I          BslI ><
                                >< MaeIII          >< BsaJI          BsiYI ><
    >< HinfI>< AciI          >< BsaJI          BsiYI ><
ACAAGTCTTT CAAAACCATT GTTGAGTCCT GCGGTAAC TAAGTTACC AAGGGAAAGC CCGTAAAGG
  1760          1770          1780          1790          1800          1810          1820

                                >< Sau3AI
                                >< NdeII
                                >< MboI
                                >< DpnII
                                >< DpnI >< Tru9I
                                >< BspAI >< MseI
                                >< Bsp143I
                                >< Van91I
                                >< PflMI
                                >< DraIII
                                >< BslI
                                >< BsiYI
                                >< BbvI
                                >< AccB7I          Fnu4HI ><
                                >< MnlI

```

FIGURE 13.5



19/116

```

TGCTTGAAC ATTGGACAAC AGAGATCAGT TTTAACACCA CTGTGTGGTT TTCCCTCACA GGCTGCTGGT
1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890

      >< ThaI
      >< SfaNI
      >< MvnI
      >< HinPII
    >< HinPII
    >< Hin6I
    >< Hin6I
      >< HhaI
    >< Sau3AI      >< HhaI
    >< NdeII      >< CfoI
    >< MboI      >< CfoI
    >< DpnII      >< BstUI
    >< DpnI      >< BssHII
    >< BspAI      >< Bsp50I
    >< Bsp143I    >< AccII
    >< Bsp143I    >< AccII      >< Fnu4HI      >< BbvI
GTTATCAGAT CAATTTTTCG GCGCACACTT GATGCAGCAA ACCACTCAAT TCCTGATTTC CAAAGAGCAG
1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960

      >< TthHB8I
      >< StyI
      >< NcoI
    >< HindII
    >< HincII
    >< HinfI
      >< EcoT14I
      >< Eco57I
    >< TaqI>< Eco130I
    >< SalI >< DsaI
    >< RtrI >< BssT1I
      >< BsaHI
      >< BbiII>< NlaIII
      >< AcyI >< HgaI
    >< MaeIII
      >< BbvI
      >< MaeII >< AccI>< BsaJI      HphI ><
CTGTCAACAT ACTTGATGGT ATTTCTGAAC AGTCATTACG TCTTGTGCGAC GCCATGGTTT ATACTTCAGA
1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030

      >< RsaI
      >< NdeI      >< Csp6I
    >< BspMI
    >< MaeIII >< BsrI >< AfaI      >< DdeI
CCTGCTCACC AACAGTGTCA TTATTATGGC ATATGTAAGT GGTGGTCTTG TACAACAGAC TTCTCAGTGG
2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100

      >< StuI
      >< Pali
      >< HaeIII
      >< Eco147I
    >< SduI      >< DdeI
    >< NspII      >< BsuRI
    >< Bsp1286I    >< BshI
    >< BmyI      >< AatI      >< MnlI      DdeI ><
TTGTCTAATC TTTTGGGCAC TACTGTTGAA AAACTCAGGC CTATCTTTGA ATGGATTGAG GCCAAACTTA
2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170

      >< TfiI
      >< HinfI
      >< FokI
    >< SfaNI >< BsgI
    >< SfaNI >< BsgI      Tth111I ><
GTGCAGGAGT TGAATTTCTC AAGGATGCTT GGGAGATTCT CAAATTTCTC ATTACAGGTG TTTTTCACAT
2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240

```

FIGURE 13.6

20/116

```

                                Tru9I ><
                                MseI ><
                                HpaI >
                                HindII >
                                HincII >
>< Eco57I
CGTCAAGGGT CAAATACAGG TTGCTTCAGA TAACATCAAG GATTGTGTAA AATGCTTCAT TGATGTTGTT
    2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310

                                >< Sau3AI
                                >< NdeII
                                >< MboI
                                > < MaeIII
                                >< FbaI
                                >< DpnII
                                >< DpnI
                                >< BspAI
                                >< Bsp143I
                                >< TthHB8I
                                >< TaqI
AACAAAGGCAC TCGAAATGTG CATTGATCAA GTCACATATCG CTGGCGCAAA GTTGCGATCA CTCAACTTAG
    2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380

                                >< PvuII
                                >< MaeII
                                >< Bst1107I
                                >< BsaAI
                                >< BbvI
                                > < Fnu4HI
                                >< HphI
                                >< DrdI
                                >< AccI
                                >< AluI
GTGAAGTCTT CATCGCTCAA AGCAAGGGAC TTTACCGTCA GTGTATACGT GGCAAGGAGC AGCTGCAACT
    2390      2400      2410      2420      2430      2440      2450

                                >< Tru9I
                                >< NlaIV
                                >< MseI
                                >< MnlI
                                >< Esp4I
                                >< Eco64I
                                >< BscBI
                                >< NlaIII >< BanI
                                >< AflII
                                >< BbvI
                                >< AccBI
                                >< MaeIII
                                >< TfiI
                                >< HinfI
                                >< HphI
                                >< AfaI
ACTCATGCCT CTTAAGGCAC CAAAAGAAGT AACCTTCTT GAAGGTGATT CACATGACAC AGTACTTACC
    2460      2470      2480      2490      2500      2510      2520

                                > < XhoI
                                >< TthHB8I
                                >< TthHB8I>< TaqI
                                > < SlaI
                                > < PaeR7I
                                > < NspIII
                                >< HphI >< HinfI
                                > < Eco88I
                                > < CcrI
                                >< Esp3I >< BsaHI
                                > < BcoI
                                >< BsmAI >< BbiII
                                > < AvaI
                                >< TaqI > < Ama87I>< BsmBI
                                >< Alw26I >< AcyI
                                >< DdeI>< MnlI
                                >< AluI
TCTGAGGAGG TTGTTCTCAA GAACGGTGAA CTCGAAGCAC TCGAGACGCC CGTTGATAGC TTCACAAATG
    2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590

```

FIGURE 13. 7

21/116

```

>< AluI      >< BsrI      >< Pali >< NlaIII
GAGCTATCGT TGGCACACCA GTCTGTGTAA ATGGCCTCAT GCTCTTAGAG ATTAAGGACA AAGAACAATA
2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660

>< VneI
Tru9I ><
>< SfiI
>< SduI
>< NspII
MseI ><
>< HgiAI
Bsp1286I >< BstI ><
BsiYI ><
>< BmyI
>< ApaLI
>< Tru9I >< Alw44I
>< MseI >< Alw21I
CTGCGCATTG TCTCCTGGTT TACTGGCTAC AAACAATGTC TTTCGCTTAA AAGGGGGTGC ACCAATTAAA
2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730

>< MaeIII      >< MboII      > < MaeIII      >< HinfI AluI ><
GGTGTAACCT TTGGAGAAGA TACTGTTTGG GAAGTTCAAG GTTACAAGAA TGTGAGAATC ACATTTGAGC
2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800

>< RsaI
>< NlaIV
MaeIII ><
>< MspI >< KpnI
>< HpaII
>< HapII
> < Eco64I
>< SduI >< Csp6I
>< NspII >< TfiI >< BscBI
>< HgiAI > < BanI
>< Bsp1286I > < Asp718
>< BmyI >< HinfI >< AfaI
>< Alw21I > < AccB1I
>< AccI > < Acc65I
TTGATGAACG TGTTGACAAA GTGCTTAATG AAAAGTGCTC TGTCTACACT GTTGAATCCG GTACCGAAGT
2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870

>< Sau3AI
>< NdeII
>< MboI
>< DpnII
> < DpnI
>< NspI
>< NspHI
>< NlaIII
>< MboII >< BspAI
> < BsrI > < Bsp143I
>< DdeI >< MnlI >< AlwNI >< BbsI >< AlwNI
TACTGAGTTT GCATGTGTTG TAGCAGAGGC TGTGTGTAAG ACTTTACAAC CAGTTTCTGA TCTCCTTACC
2880      2890      2900      2910      2920      2930      2940

>< Sau3AI
>< NdeII
>< MboI
>< DpnII
>< DpnI
>< BspAI

```

FIGURE 13.8

22/11 6

```

    >< NlaIII>< Bsp143I          >< AluI          >< SfaNI
AACATGGGTA TTGATCTTGA TGAGTGGAGT GTAGCTACAT TCTACTTATT TGATGATGCT GGTGAAGAAA
  2950          2960          2970          2980          2990          3000          3010

                                >< SfaNI
                                >< MnlI
                                >< Ksp632I          >< MnlI
                                >< EarI          >< MboII
                                >< Eam1104I          >< MboII
    >< MboII          >< GsuI          >< MnlI          >< MboII
    >< HphI          >< MaeII>< BpmI          >< MnlI          >< MboII
ACTTTTCATC ACGTATGTAT TGTTCCTTTT ACCCTCCAGA TGAGGAAGAA GAGGACGATG CAGAGTGTGA
  3020          3030          3040          3050          3060          3070          3080

                                >< RsaI
                                >< RsaI
                                >< NlaIII
                                >< MnlI          >< FokI
                                >< Csp6I          Eco31I ><
                                >< Csp6I          >< MamI BsmAI ><
                                >< MboII          >< AfaI          >< BsiBI BsaI ><
                                >< MboII          >< AfaI          >< BsaB1Alw26I ><
GGAAGAAGAA ATTGATGAAA CCTGTGAACA TGAGTACGGT ACAGAGGATG ATTATCAAGG TCTCCCTCTG
  3090          3100          3110          3120          3130          3140          3150

    >< NlaIV>< PvuII>< XmnI
    >< Eco64I >< Psp5I          >< TthHB8I
    >< MnlI >< DdeI          >< TaqI          >< MnlI          >< MboII
    >< BscBI>< NspBII >< MnlI          >< Ksp632I          >< MboII >< MboII
    >< BanI          >< MnlI          >< EarI          >< BsrI
    >< AccB1I >< AluI >< Asp700I          >< Eam1104I >< MboII>< BbsI
GAATTTGGTG CCTCAGCTGA AACAGTTCGA GTTGAGGAAG AAGAAGAGGA AGACTGGCTG GATGATACTA
  3160          3170          3180          3190          3200          3210          3220

                                >< Tru9I
    >< FokI          >< MseI          >< Eco57I
    >< DdeI          >< BsrI>< MboII BsrI ><
CTGAGCAATC AGAGATTGAG CCAGAACCAG AACCTACACC TGAAGAACCA GTTAATCAGT TTACTGGTTA
  3230          3240          3250          3260          3270          3280          3290

    >< Tru9I          >< MnlI
    >< MseI          >< Tru9I >< HindII>< Tru9I          >< DraIII
    >< DraI          >< MseI >< HincII>< MseI          >< BspWI
TTTAAAACTT ACTGACAATG TTGCCATTAA ATGTGTTGAC ATCGTTAAGG AGGCACAAAG TGCTAATCCT
  3300          3310          3320          3330          3340          3350          3360

                                >< VneI
                                >< SniI
                                >< SduI
                                >< NspII
                                >< HgiAI
                                >< Bsp1286I
                                >< BmyI
                                >< ApaLI
                                >< Alw44I
    >< BbvI          >< HphI          >< NlaIII          >< BspMI          >< Alw21I
ATGGTGATTG TAAATGCTGC TAACATACAC CTGAAACATG GTGGTGGTGT AGCAGGTGCA CTCACAAGG
  3370          3380          3390          3400          3410          3420          3430

                                >< Sau96I
                                >< Pali
                                >< NspIV
                                >< HaeIII
                                >< Cfr13I
    >< NlaIV

```

FIGURE 13.9

23/116

```

>< Eco64I                >< BsuRI
  >< BscBI                > < Tru9I    >< BsiZI
>< BaniI                > < MseI      >< BshI      >< MnlI
  >< AccB1I>< NlaIII      >< AluI    >< AsuI    >< MnlI
CAACCAATGG TGCCATGCAA AAGGAGAGTG ATGATTACAT TAAGCTAAAT GGCCCTCTTA CAGTAGGAGG
  3440      3450      3460      3470      3480      3490      3500

                                >< SinI
                                >< Sau96I
                                >< NspIV
                                >< NspHI>< NspHII
                                >< Eco47I
                                >< Cfr13I
                                >< NlaIII    >< BspMI
                                >< BsiZI
                                >< Bme18I
                                >< AvaII MnlI ><
                                >< NspI>< AsuI FokI ><
GTCTTGTTTG CTTTCTGGAC ATAATCTTGC TAAGAAGTGT CTGCATGTTG TTGGACCTAA CCTAAATGCA
  3510      3520      3530      3540      3550      3560      3570

                                > < DdeI
                                >< NspI>< AsuI FokI ><
                                >< HphI> < MseI
                                >< Esp4I
                                >< AluI      > < NdeI
                                >< AflIII>< Fnu4HI    >< BbvI
GGTGAGGACA TCCAGCTTCT TAAGGCAGCA TATGAAAATT TCAATTCACA GGACATCTTA CTTGCACCAT
  3580      3590      3600      3610      3620      3630      3640

                                >< Tru9I
                                >< HphI> < MseI
                                >< Esp4I
                                >< AluI      > < NdeI
                                >< AflIII>< Fnu4HI    >< BbvI
GGTGAGGACA TCCAGCTTCT TAAGGCAGCA TATGAAAATT TCAATTCACA GGACATCTTA CTTGCACCAT
  3580      3590      3600      3610      3620      3630      3640

                                RsaI ><
                                Csp6I ><
                                AfaI ><
                                >< Eco57I
                                >< BcgI
TGTTGTCAGC AGGCATATTT GGTGCTAAAC CACTTCAGTC TTTACAAGTG TGCGTGCAGA CGGTTTCGTAC
  3650      3660      3670      3680      3690      3700      3710

                                >< BsgI
                                >< BspMI
                                >< BcgI/a
                                >< AluI
ACAGGTTTAT ATTGCAGTCA ATGACAAAGC TCTTTATGAG CAGGTTGTCA TGGATTATCT TGATAACCTG
  3720      3730      3740      3750      3760      3770      3780

                                >< NlaIII
                                >< MnlI
                                >< RmaI
                                > < MnlI
                                >< NlaIV
                                >< TfiI    >< MboII
                                >< MaeI
                                >< Eco57I
                                >< BscBI
                                >< HinfI    >< DdeI
AAGCCTAGAG TGGGAAGCACC TAAACAAGAG GAGCCACCAA ACACAGAAGA TTCCAAAAC T GAGGAGAAAT
  3790      3800      3810      3820      3830      3840      3850

                                >< Tru9I
                                >< StuI
                                >< Pali
                                >< MseI    >< MnlI    >< MaeIII
                                >< HaeIII
                                >< Eco0651
                                >< Eco147I
                                >< Eco91I
                                >< BsuRI
                                >< BstXI ><
                                >< BshI
                                >< BstPI
                                >< AatI
                                >< BstEII
CTGTCGTACA GAAGCCTGTC ATGTGTAAGC CAAAAATTAA GGCCTGCATT GATGAGGTTA CCACAACACT
  3860      3870      3880      3890      3900      3910      3920

                                TfiI ><
                                NlaIII ><
                                HinfI ><
                                >< DdeI
                                >< EcoRV    >< HindIII

```

FIGURE 13.10

```

>< BsrI      >< MboII      >< MaeIII      >< Eco32I      >< AluI
GGAAGAACT AAGTTTCTTA CCAATAAGTT ACTCTTGTTT GCTGATATCA ATGGTAAGCT TTACCATGAT
  3930      3940      3950      3960      3970      3980      3990

      >< NspI
      >< NspHI
      >< NlaIII      >< SfaNI
>< MnlI      >< EcoNI
      >< DdeI      >< MboII >< BslI      >< NlaIII
>< DdeI      >< BfrI      >< HphI      >< BsiYI      >< FokI
TCTCAGAACA TGCTTAGAGG TGAAGATATG TCTTTCCTTG AGAAGGATGC ACCTTACATG GTAGGTGATG
  4000      4010      4020      4030      4040      4050      4060

>< SpeI
>< RmaI
>< MaeI      >< EcoRV>< HphI      >< SfaNI
>< HphI      >< Eco32I      >< MnlI      >< DdeI
TTATCACTAG TGGTGATATC ACTTGTTGTTG TAATACCCTC CAAAAAGGCT GGTGGCACTA CTGAGATGCT
  4070      4080      4090      4100      4110      4120      4130

      >< ScrFI
      >< RsaI
      >< MvaI
      >< EcoRII
      >< Ecl136I
      >< DsaV
      >< Csp6I >< EcoNI
      >< BstOI
      >< BstNI
      >< BsiLI
      >< BsaJI
      >< BsaAI      >< BslI
      >< MaeII>< ApyI
      >< AfaI      >< BsiYI
>< AluI      >< BsrI      >< MboII      >< MaeII>< ApyI
CTCAAGAGCT TTGAAGAAAG TGCCAGTTGA TGAGTATATA ACCACGTACC CTGGACAAGG ATGTGCTGGT
  4140      4150      4160      4170      4180      4190      4200

      >< Tru9I
      >< MseI
      >< DdeI      >< Esp4I      >< RsaI
>< MnlI      >< BspWI      >< Csp6I
>< FokI      >< AluI      >< AflII      >< Eco57I >< AfaI
TATACACTTG AGGAAGCTAA GACTGCTCTT AAGAAATGCA AATCTGCATT TTATGTACTA CCTTCAGAAG
  4210      4220      4230      4240      4250      4260      4270

      >< ScrFI
      >< MvaI
      >< EcoRII
      >< XmnI      >< Ecl136I      NlaIII ><
      >< Ksp632I      >< RmaI      >< DsaV      Ksp632I ><
      >< EarI      >< TfiI>< MboII      >< BstOI      >< EarI
      >< Eam1104I      >< MaeI      >< BstNI      Eam1104I ><
      >< DdeI      >< HinfI      >< BsiLI      BsmAI ><
      >< BspWI      >< Asp700I      >< ApyI      Alw26I ><
CACCTAATGC TAAGGAAGAG ATTCTAGGAA CTGTATCCTG GAATTTGAGA GAAATGCTTG CTCATGCTGA
  4280      4290      4300      4310      4320      4330      4340

      >< VspI      >< Zsp2I
      >< Tru9I      >< Ppu10I
      >< MseI      >< NsiI
>< MboII      >< NlaIII      >< FokI
      >< Eco57I      >< Mph1103I      >< FokI

```

FIGURE 13. 11

```

      >< AsnI      >< EcoT22I      >< BspWI
      >< AseI      >< AvaIII      >< BglI      >< MaeII
AGAGACAAGA AAATTAATGC CTATATGCAT GGATGTTAGA GCCATAATGG CAACCATCCA ACGTAAGTAT
      4350      4360      4370      4380      4390      4400      4410

      >< SfaNI
      >< Tru9I      > < HindII      >< TfiI      >< SpeI
      >< MseI      > < HincII>< MboII      >< RmaI
      >< MnlI      >< DrdI >< HinfI      >< MaeI
AAAGGAATTA AAATTCAAGA GGGCATCGTT GACTATGGTG TCCGATTCTT CTTTATACT AGTAAAGAGC
      4420      4430      4440      4450      4460      4470      4480

      >< MaeIII
>< SfcI      >< Fnu4HI      >< MunI
      >< AluI      >< AluI      >< AciI      MaeIII ><
CTGTAGCTTC TATTATTACG AAGCTGAACT CTCTAAATGA GCCGCTTGTC ACAATGCCAA TTGGTTATGT
      4490      4500      4510      4520      4530      4540      4550

      >< ThaI
      >< MvnI
      >< MboII
      >< HinPII
      >< HinPII
      >< Hin6I
      >< Hin6I
      >< HhaI
      >< HhaI
      >< Tru9I      >< Fnu4HI
      >< NlaIII      >< Fnu4HI
      >< MseI      >< CfoI
      >< MnlI      >< CfoI
      >< Ksp632I      >< BstUI
      >< EarI      >< BssHII>< BspWI      >< Tru9I
      >< Eam1104I      >< Bsp50I      >< MseI
      >< BbvI      >< AccII      >< AluI      HphI ><
GACACATGGT TTTAATCTTG AAGAGGCTGC GCGCTGTATG CGTTCCTCTTA AAGCTCCTGC CGTAGTGTC
      4560      4570      4580      4590      4600      4610      4620

      >< MaeIII
      >< SfaNI      >< AlwNI      >< MnlI >< MnlI>< DdeI
GTATCATCAC CAGATGCTGT TACTACATAT AATGGATACC TCACTTCGTC ATCAAAGACA TCTGAGGAGC
      4630      4640      4650      4660      4670      4680      4690

      >< SinI
      >< Sau96I
      >< NspIV
      >< NspHII
      >< SduI      >< Eco47I
      >< NspII      >< Cfr13I
      >< HgiAI      >< BsiZI
      >< Bsp1286I      >< Bme18I      >< RsaI
      >< BmyI      >< AvaII      >< Csp6I
      >< Alw21I      >< AsuI      >< AfaI
ACTTTGTAGA AACAGTTTCT TTGGCTGGCT CTTACAGAGA TTGGTCCTAT TCAGGACAGC GTACAGAGTT
      4700      4710      4720      4730      4740      4750      4760

      > < TthHB8I
      > < TaqI
      >< SduI
      >< Van91I      >< NspII
      >< Tru9I      >< RsaI      >< PflMI      >< Eco24I
      >< MseI      >< HphI      >< BslI      >< Bsp1286I
      >< Esp4I      >< Csp6I      >< BsiYI      >< BmyI      >< GsuI ><

```

FIGURE 13.12

26/116

```

      >< AflIII >< MaeIII >< AfaI >< AccB7I >< BanIIBpmI ><
AGGTGTTGAA TTTCTTAAGC GTGGTGACAA AATTGTGTAC CACACTCTGG AGAGCCCCGT CGAGTTTCAT
  4770      4780      4790      4800      4810      4820      4830

                                >< Tru9I
                                >< PleI >< EcoNI
                                >< MnlI >< BslI
                                >< BsmAI >< BsiYI
>< MnlI >< HphI >< HinfI>< Alw26I>< AciI >< MseI
CTTGACGGTG AGGTTCTTTC ACTTGACAAA CTAAAGAGTC TCTTATCCCT GCGGGAGGTT AAGACTATAA
  4840      4850      4860      4870      4880      4890      4900

                                >< AluI >< NdeI
AAGTGTTTAC AACTGTGGAC AACACTAATC TCCACACACA GCTTGTGGAT ATGTCTATGA CATATGGACA
  4910      4920      4930      4940      4950      4960      4970

>< SinI
>< Sau96I
>< NspIV
>< NspHII
>< Eco47I
>< Cfr13I
>< BsiZI
>< Bme18I
>< AvaII
>< AsuI
                                >< MaeIII >< Tru9I >< MnlI
                                >< FokI >< MseI >< BspHI
GCAGTTTGGT CCAACATACT TGGATGGTGC TGATGTTACA AAAATTAAAC CTCATGTAAA TCATGAGGGT
  4980      4990      5000      5010      5020      5030      5040

                                > < TthHB8I
                                > < TaqI
>< RsaI
> < RmaI >< SnaBI >< ScaI
> < MaeI >< MaeII >< HindIII >< RsaI
>< Csp6I >< Eco105I >< Csp6I
>< AfaI >< BsaAI >< AluI >< AfaI
AAGACTTTCT TTGTACTACC TAGTGATGAC ACACTACGTA GTGAAGCTTT CGAGTACTAC CATACTCTTG
  5050      5060      5070      5080      5090      5100      5110

>< RsaI
>< NspI
>< NspHI
>< NlaIII
> < Csp6I >< Tru9I MnlI >
>< AflIII >< MseI BslI ><
>< AfaI >< DraI BsiYI ><
ATGAGAGTTT TCTTGGTAGG TACATGTCTG CTTTAAACCA CACAAAGAAA TGGAAATTTT CTCAAGTTGG
  5120      5130      5140      5150      5160      5170      5180

>< Tru9I >< Tru9I >< RmaI
>< MseI >< MseI >< MunI >< MaeI AluI >
TGGTTTAACT TCAATTAAAT GGGCTGATAA CAATTGTTAT TTGTCTAGTG TTTTATTAGC ACTTCAACAG
  5190      5200      5210      5220      5230      5240      5250

                                >< SfaNI
                                >< SduI
                                >< NspII
                                >< Eco24I
                                >< Bsp1286I
                                >< BmyI HphI >
                                >< BbvI Fnu4HI ><
                                >< BanII >< BspWI
>< MnlI

```

FIGURE 13.13



```

CTTGAAGTCA AATTCAATGC ACCAGCACTT CAAGAGGCTT ATTATAGAGC CCGTGCTGGT GATGCTGCTA
  5260          5270          5280          5290          5300          5310          5320

>< VneI
>< SnoI
    >< SduI
    >< NspII
    >< HgiAI
    >< Bsp1286I
    >< BmyI
>< ApaLI
>< Alw44I
    >< Alw21I
    >< AluI
    MboII ><
    >< HphI
ACTTTTGTGC ACTCATACTC GCTTACAGTA ATAAAACTGT TGGCGAGCTT GGTGATGTCA GAGAAACTAT
  5330          5340          5350          5360          5370          5380          5390

    > < SphI
    > < PaeI
    > < NspI
    > < NspHI >< TfiI
    >< Tru9I
    >< SfcI > < NlaIII>< HinfI
    >< MseI
GACCCATCTT CTACAGCATG CTAATTTGGA ATCTGCAAAG CGAGTTCTTA ATGTGGTGTG TAAACATTGT
  5400          5410          5420          5430          5440          5450          5460

    >< Tru9I
    >< MseI
    >< AluI
    >< RsaI
    > < Csp6I
    Esp4I >
    >< AfaI
    AflIII >
GGTCAGAAAA CTACTACCTT AACGGGTGTA GAAGCTGTGA TGTATATGGG TACTCTATCT TATGATAATC
  5470          5480          5490          5500          5510          5520          5530

    >< RsaI
    >< MboII
    >< RmaI HinfI ><
    >< Csp6I
    >< MaeI >< BbsI
    >< AfaI
>< Tru9I
    >< SfaNI
>< MseI
    >< NlaIII
TTAAGACAGG TGTTTCCATT CCATGTGTGT GTGGTCGTGA TGCTACACAA TATCTAGTAC AACAAGAGTC
  5540          5550          5560          5570          5580          5590          5600

    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AfaI
    >< DdeI
    >< BspWI >< BspMI
    >< PleI
    >< BsgI
TTCTTTTGTG ATGATGTCTG CACCACCTGC TGAGTATAAA TTACAGCAAG GTACATTCTT ATGTGCGAAT
  5610          5620          5630          5640          5650          5660          5670

    >< RsaI
    > < MaeIII
    >< Csp6I
    >< AfaI
    >< BsrI
    >< Eco31I
    >< DdeI
    >< BsmAI
    >< BsaI
    >< Alw26I
    MnI ><
    >< HphI
GAGTACACTG GTAACATCA GTGTGGTCAT TACTACTATA TAACTGCTAA GGAGACCCTC TATCGTATTG
  5680          5690          5700          5710          5720          5730          5740

    >< SstI
    >< SduI
    >< SacI
    >< NspII
    >< HgiAI
    >< Eco24I
    >< Ecl136II
    >< Bsp1286I
    >< BmyI
    >< SinI
    >< Sau96I
    >< NspIV
    >< NspHII
    > < RsaI
    >< MaeIII
    >< Eco47I
    >< Cfr13I
    >< BsiZI
    >< Bmel8I

```

FIGURE 13. 14

28/116

```

    >< BanII                >< AvaII
    >< Alw21I              >< Csp6I>< AsuI
    >< AluI                > < AfaI >< BsrI>< AlwNI
ACGGAGCTCA CCTTACAAAG ATGTCAGAGT ACAAAGGACC AGTGACTGAT GTTTTCTACA AGGAAACATC
    5750          5760          5770          5780          5790          5800          5810

                                >< TthHB8I
                                >< TaqI >< MaeIII
TTACACTACA ACCATCAAGC CTGTGTCGTA TAAACTCGAT GGAGTTACTT ACACAGAGAT TGAACCAAAA
    5820          5830          5840          5850          5860          5870          5880

                                                >< RsaI
                                                >< Csp6I
                                >< SfcI >< BbvI
                                >< Fnu4HI
TTGGATGGGT ATTATAAAAA GGATAATGCT TACTATACAG AGCAGCCTAT AGACCTTGTA CCAACTCAAC
    5890          5900          5910          5920          5930          5940          5950

                                                Tru9I ><
                                                SwaI ><
                                                MseI ><
                                > < NspI                MamI ><
                                > < NspHI              DraI ><
                                > < NlaIII             BsiBI ><
                                >< AflIII             BsaBI ><
CATTACCAAA TGCGAGTTTT GATAATTTCA AACTCACATG TTCTAACACA AAATTTGCTG ATGATTTAAA
    5960          5970          5980          5990          6000          6010          6020

                                >< MboII
                                >< AluI    >< AluI>< MaeIII
TCAAATGACA GGCTTCACAA AGCCAGCTTC ACGAGAGCTA TCTGTCACAT TCTTCCCAGA CTTGAATGGC
    6030          6040          6050          6060          6070          6080          6090

                                >< SfcI
GATGTAGTGG CTATTGACTA TAGACACTAT TCAGCGAGTT TCAAGAAAGG TGCTAAATTA CTGCATAAGC
    6100          6110          6120          6130          6140          6150          6160

    >< Tru9I
        >< ScrFI
        >< MvaI
    >< MseI
        >< EcoRII
        >< Ecl136I
        >< DsaV
        >< BstOI
        >< BstNI
        >< BsiLI
    >< MunI
        >< BstXI
        >< ApyI
        >< MaeII
        >< BstXI
CAATTGTTTG GCACATTAAC CAGGCTACAA CCAAGACAAC GTTCAAACCA AACACTTGGT GTTTACGTTG
    6170          6180          6190          6200          6210          6220          6230

        > < RsaI
        >< Csp6I
        > < AfaI>< BsrI
                                MboII ><
                                >< BbsI
TCTTTGGAGT ACAAAGCCAG TAGATACTTC AAATTCATTT GAAGTTCTGG CAGTAGAAGA CACACAAGGA
    6240          6250          6260          6270          6280          6290          6300

                                >< HindII
                                >< HincII
                                >< MboII
                                >< MnlI
                                >< Eco57I
ATGGACAATC TTGCTTGTGA AAGTCAACAA CCCACCTCTG AAGAAGTAGT GGAAAATCCT ACCATACAGA
    6310          6320          6330          6340          6350          6360          6370

```

FIGURE 13.15

29/116

```

      >< MaeIII
      >< MaeII
AGGAAGTCAT AGAGTGTGAC GTGAAAAC TA CCGAAGTTGT AGGCAATGTC ATACTTAAAC CATCAGATGA
6380          6390          6400          6410          6420          6430          6440

      >< XhoII
      >< Sau3AI
      >< NlaIII
      >< NdeII
      >< MflI
      >< MboI
      >< DpnII
      >< DpnI
      >< BstYI
      >< BspAI
      >< Tru9I
      >< MseI
      >< BspHI >< BspI43I>< Fnu4HI
      >< MaeIII >< MnlI >< BbvI >< AlwI
AGGTGTTAAA GTAACACAAG AGTTAGGTCA TGAGGATCTT ATGGCTGCTT ATGTGGAAAA CACAAGCATT
6450          6460          6470          6480          6490          6500          6510

      >< SauI
      >< RmaI
      >< MstII
      >< MaeI
      >< Eco81I
      >< DdeI
      >< CvnI
      >< Bsu36I
      >< Bse21I
      >< BfrI> < Tru9I
      >< AxyI> < MseI>< MnlI >< NlaIII
      >< MseI >< AluI >< AocI >< DraI >< BbvI Fnu4HI ><
ACCATTAAGA AACCTAATGA GCTTTCAC TA GCCTTAGGTT TAAAAACAAT TGCCACTCAT GGTATTGCTG
6520          6530          6540          6550          6560          6570          6580

      >< VspI >< StyI
      >< Tru9I >< EcoT14I
      >< MseI >< Eco130I
      >< AsnI >< BssT1I
      >< AseI >< BsaJI
      >< BfrI >< Fnu4HI
CAATTAATAG TGTTCCTTGG AGTAAAATTT TGGCTTATGT CAAACCATT TTAGGACAAG CAGCAATTAC
6590          6600          6610          6620          6630          6640          6650

      >< HinPII
      >< Hin6I
      >< HhaI
      >< DdeI
      >< BbvI >< CfoI
      >< Tru9I
      >< MaeII>< MseI
      >< DraIII
      >< AflIII
AACATCAAAT TCGGCTAAGA GATTAGCACA ACGTGTGTTT AACAATTATA TGCCTTATGT GTTTACATTA
6660          6670          6680          6690          6700          6710          6720

      >< RsaI >< RsaI>< XbaI
      >< Csp6I >< Csp6I >< RmaI
      >< MunI >< AfaI >< AfaI >< MaeI >< AluI
TTGTTCCAAT TGTGTACTTT TACTAAAAGT ACCAATTCTA GAATTAGAGC TTCCTACCT ACAACTATTG
6730          6740          6750          6760          6770          6780          6790

      >< VspI
      >< Tru9I
      >< NaeI
      >< MspI
      >< MseI

```

FIGURE 13. 16

30/116

```

                                >< HpaII
                                >< HapII
                                >< Cfr10I >< FokI
                                >< AsnI
                                >< AseI>< HphI>< MaeIII
                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< SfaNI
CTAAAAATAG TGTTAAGAGT GTTGCTAAAT TATGTTTGGA TGCCGGCATT AATTATGTGA AGTCACCCAA
6800      6810      6820      6830      6840      6850      6860
                                >< Tru9I >< DdeI MaeIII >
                                >< MseI >< BfrI >< BbvI
ATTTTCTAAA TTGTTACAAA TCGCTATGTG GCTATTGTTG TTAAGTATTT GCTTAGGTTT TCTAATCTGT
6870      6880      6890      6900      6910      6920      6930
                                >< SduI
                                >< NspII
                                >< HgiAI
                                >< Bsp1286I
                                >< BmyI
                                >< Alw21I
                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< Fnu4HI >< AfaI
GTAAGTCTG CTTTGGTGT ACTCTTATCT AATTTTGGTG CTCCTTCTTA TTGTAATGGC GTTAGAGAAT
6940      6950      6960      6970      6980      6990      7000
                                >< Tru9I ><
                                >< MseI ><
                                >< Fnu4HI
                                >< MaeIII
                                >< MaeII
                                >< BbvI >
TGTATCTTAA TTCGTCTAAC GTTACTACTA TGGATTCTG TGAAGGTTCT TTTCCTTGCA GCATTTGTTT
7010      7020      7030      7040      7050      7060      7070
                                >< TfiI
                                >< MamI
                                >< HinfI
                                >< BsiBI
                                >< XmnI>< MaeIII
                                >< AluI >
                                >< PleI>< HinfI
                                >< BsaBI >< AluI
                                >< Asp700I
                                >< AfaI >
AAGTGGATTA GACTCCCTTG ATTCTTATCC AGCTCTTGAA ACCATTTCAGG TGACGATTTC ATCGTACAAG
7080      7090      7100      7110      7120      7130      7140
                                >< Pali
                                >< NspBII
                                >< HaeIII
                                >< GdiII
                                >< Fnu4HI
                                >< EaeI
                                >< DdeI
                                >< BsuRI
                                >< BshI >< BslI
                                >< MaeI
                                >< AciI>< BsiYI
CTAGACTTGA CAATTTTAGG TCTGGCCGCT GAGTGGGTTT TGGCATATAT GTTGTTTACA AAATTCTTTT
7150      7160      7170      7180      7190      7200      7210
                                >< BspMI
                                >< AluI
                                >< RmaI
                                >< MaeI
ATTTATTAGG TCTTTCAGCT ATAATGCAGG TGTTCTTTGG CTATTTTGCT AGTCATTTC A TCAGCAATTC
7220      7230      7240      7250      7260      7270      7280
                                >< RsaI ><
                                >< MboII
                                >< NlaIV
                                >< Eco64I
                                >< RsaI >< BscBI
                                >< Csp6I >< BanI
                                >< AfaI>< AccBII
                                >< NlaIII
                                >< BsiBI ><
                                >< BsaBI ><
                                >< AfaI ><

```

FIGURE 13.17

31/116

```

TTGGCTCATG TGGTTTATCA TTAGTATTGT ACAAATGGCA CCCGTTTCTG CAATGGTTAG GATGTACATC
  7290          7300          7310          7320          7330          7340          7350

                                TthHB8I ><
                                >< TaqI
                                MnlI ><
                                Ksp632I ><
                                >< FokI
                                >< MboII EarI ><
                                >< Eam1104I>< AluI>< MboII >< NlaIII Eam1104I ><
>< FokI
TTCTTTGCTT CTTTCTACTA CATATGGAAG AGCTATGTTT ATATCATGGA TGGTTGCACC TCTTCGACTT
  7360          7370          7380          7390          7400          7410          7420

                                XhoII ><
                                Sau3AI ><
                                NlaIII ><
                                NdeII ><
                                MflI ><
                                MboI ><
                                >< ThaI
                                >< MvnI
                                >< EarI
                                >< Eam1104I
                                DpnII ><
                                BstYI ><
                                >< NlaIII >< CfoI >< AflIII >< Csp6I >< Tru9I BspAI ><
                                >< BspWI >< BspWI >< AccII >< AfaI >< MseI BglIII ><
GCATGATGTG CTATAAGCGC AATCGTGCCA CACGCGTTGA GTGTACAAC ATTGTTAATG GCATGAAGAG
  7430          7440          7450          7460          7470          7480          7490

                                >< Pali
                                >< HaeIII
                                >< DsaI
                                >< MboII
                                >< BsuRI
                                >< BshI
                                >< MunI
                                >< DpnI
                                >< Bsp143I
                                >< MnlI
                                >< BsaJI >< PleI>< HinfI
                                >< MunI
                                >< BsmAI ><
                                >< Alw26I ><
ATCTTTCTAT GTCTATGCAA ATGGAGGCCG TGGCTTCTGC AAGACTCACA ATTGGAATTG TCTCAATTGT
  7500          7510          7520          7530          7540          7550          7560

                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< BsrI
                                >< AfaI
                                >< GsuI
                                >< BpmI
                                >< Tru9I ><
                                >< MseI ><
                                >< MaeIIIDraI ><
                                >< BsrI
GACACATTTT GCACTGGTAG TACATTCATT AGTGATGAAG TTGCTCGTGA TTTGTCACTC CAGTTTAAAA
  7570          7580          7590          7600          7610          7620          7630

                                >< ThaI
                                >< MvnI
                                >< HphI
                                >< HinPII ><
                                >< HinPII
                                >< Hin6I
                                >< Hin6I
                                >< HhaI ><
                                >< HhaI
                                >< CfoI ><
                                >< CfoI
                                >< BstUI
                                >< BssHII
                                Bsp50I ><
                                >< BsrI
                                >< AccII
GACCAATCAA CCCTACTGAC CAGTCATCGT ATATTGTTGA TAGTGTTGCT GTGAAAAATG GCGCGCTTCA
  7640          7650          7660          7670          7680          7690          7700

```

FIGURE 13. 18

32/116

```

                >< FokI
                    >< BsmAI
                >< MnlI                >< Alw26I                >< AciI
CCTCTACTTT  GACAAGGCTG  GTCAAAAGAC  CTATGAGAGA  CATCCGCTCT  CCCATTTTGT  CAATTTAGAC
    7710          7720          7730          7740          7750          7760          7770

                >< VspI
                >< Tru9I
                >< MseI
                >< AsnI
                >< AseI
                >< BcgI/a
    > < AluI
AATTTGAGAG  CTAACAACAC  TAAAGGTTCA  CTGCCTATTA  ATGTCATAGT  TTTTGATGGC  AAGTCCAAAT
    7780          7790          7800          7810          7820          7830          7840

                >< SfcI                >< PvuII
                >< RsaI                >< Psp5I
                >< Csp6I                >< NspBII
    >< HinfI    >< DdeI    >< BcgI    >< AfaI    >< AluI
GCGACGAGTC  TGCTTCTAAG  TCTGCTTCTG  TGTACTACAG  TCAGCTGATG  TGCCAACCTA  TTCTGTTGCT
    7850          7860          7870          7880          7890          7900          7910

                TthHB8I ><
                TaqI ><
                SalI ><
                RtrI ><
                HindII >
                HincII >
                >< ScaI
                >< RsaI                >< Tru9I
                >< Csp6I                >< SfaNI >< Eco57I
                >< AfaI                >< MseI                AccI ><
    >< AluI                >< MaeII
TGACCAAGCT  CTTGTATCAG  ACGTTGGAGA  TAGTACTGAA  GTTTCCGTTA  AGATGTTTGA  TGCTTATGTC
    7920          7930          7940          7950          7960          7970          7980

                >< Tru9I
                >< MseI
                > < Esp4I                >< SfcI
                > < AflIII                >< BspWI >< AluI
GACACCTTTT  CAGCAACTTT  TAGTGTTTCT  ATGGAAAAAC  TTAAGGCACT  TGTTGCTACA  GCTCACAGCG
    7990          8000          8010          8020          8030          8040          8050

                >< PvuII
                >< Psp5I
                >< NspBII
                >< Fnu4HI
                >< AluI
    >< AluI                >< BbvI
AGTTAGCAAA  GGGTGTAGCT  TTAGATGGTG  TCCTTTCTAC  ATTCGTGTCA  GCTGCCCCGAC  AAGGTGTTGT
    8060          8070          8080          8090          8100          8110          8120

                >< HindII
                >< HincII
                >< BsmAI                >< DdeI
                >< FokI >< Alw26I                >< BfrI
TGATACCGAT  GTTGACACAA  AGGATGTTAT  TGAATGTCTC  AAACTTTCAC  ATCACTCTGA  CTTAGAAGTG
    8130          8140          8150          8160          8170          8180          8190

                >< XhoII
                Sau3AI ><
                >< NdeII
                >< MflI
                >< MboI
                >< NlaIII >< HgaI
                >< HinfI >< DpnII
                DpnI ><

```

FIGURE 13.19

33/116

```

                                Bsp143I ><
                                >< BsaHI >< BstYI
                                >< BbiIII >< BspAI
                                >< AclI >< BglII
                                >< MaeIII>< HphI
                                >< MaeIII >< HphI >< NlaIII
ACAGGTGACA GTTGTAAACAA TTTCATGCTC ACCTATAATA AGGTTGAAAA CATGACGCCC AGAGATCTTG
      8200          8210          8220          8230          8240          8250          8260

                                >< NspI
                                >< NspHI
                                >< NlaIII
>< HinPII
>< Hin6I
>< HhaI
>< CfoI
                                >< BspWI >< MaeIII
GCGCATGTAT TGACTGTAAT GCAAGGCATA TCAATGCCCA AGTAGCAAAA AGTCACAATG TTTCATCAT
      8270          8280          8290          8300          8310          8320          8330

                                >< NspI
                                >< NspHI
                                >< NlaIII
                                >< PvuII
                                >< Psp5I
                                >< Eam1105I
                                >< NspBII
                                >< BbvI
                                >< Fnu4HI
                                >< AflIII
                                >< AluI >< BbvI >< Fnu4HI
CTGGAATGTA AAAGACTACA TGTCTTTATC TGAACAGCTG CGTAAACAAA TTCGTAGTGC TGCCAAGAAG
      8340          8350          8360          8370          8380          8390          8400

                                >< RmaI
                                >< MaeI >< Eam1105I
                                >< MboII
AACACATAC CTTTCTAGACT AACTTGTGCT ACAACTAGAC AGGTTGTCAA TGTCATAACT ACTAAAATCT
      8410          8420          8430          8440          8450          8460          8470

                                >< Tru9I
                                >< PstI
                                >< MseI
                                >< HaeIII
                                >< ScaI
                                >< Esp4I
                                >< RsaI >< Tru9I
                                >< Csp6I >< MseI
                                >< BsuRI
                                >< BshI
                                >< AfaI >< DraI >< AflII >< BbvI
CACTCAAGGG TGGTAAGATT GTTAGTACTT GTTTAACTAT TATGCTTAAG GCCACATTAT TGTGCGTTCT
      8480          8490          8500          8510          8520          8530          8540

                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< BsrI
                                >< NlaIII
                                >< AfaI
                                >< MaeIII
>< Fnu4HI
TGCTGCATTG GTTTGTTATA TCGTTATGCC AGTACATACA TTGTCAATCC ATGATGGTTA CACAAATGAA
      8550          8560          8570          8580          8590          8600          8610

                                >< MaeIII
                                >< MaeIII
                                >< FokI
>< MaeIII
ATCATTGGTT ACAAAGCCAT TCAGGATGGT GTCACCTGTG ACATCATTTT TACTGATGAT TGTTTTGCAA
      8620          8630          8640          8650          8660          8670          8680

                                SfcI >
                                Fnu4HI ><
                                BbvI ><
                                >< NspI
                                >< NspHI
                                >< NlaIII
                                >< HgaI
                                >< BstXI
                                >< BbvI
                                >< AluI
ATAAACATGC TGGTTTGTGAC GCATGGTTTA GCCAGCGTGG TGGTTTCATAC AAAAATGACA AAAGCTGCCC
      8690          8700          8710          8720          8730          8740          8750

```

FIGURE 13. 20

34/116

```

                                >< ScrFI
                                >< ScrFI    >< RsaI
                                >< MvaI    >< MspI
                                >< EcoRII   >< HpaII
                                >< Ecl136I>< NciI
                                >< DsaV     >< HapII
                                >< BstOI>< DsaV
                                >< BstNI    >< Csp6I
                                >< BsiLI    >< BcnIDdeI ><
                                >< ApyI     >< AfaI
                                >< Fnu4HI
                                >< AluI
TGTAGTAGCT GCTATCATT CAAGAGAGAT TGGTTTCATA GTGCCTGGCT TACCGGGTAC TGTGCTGAGA
8760      8770      8780      8790      8800      8810      8820

                                > < MaeIII    >< HphI          >< MnlI          >< BspWI
GCAATCAATG GTGACTTCTT GCATTTTCTA CCTCGTGTTC TTAGTGCTGT TGGCAACATT TGCTACACAC
8830      8840      8850      8860      8870      8880      8890

                                Tru9I >
                                SfaNI ><
                                >< RsaI
                                MseI >
                                >< BspWI          >< Fnu4HI >< Csp6I
                                >< BbvI>< MnlI      >< DdeI >< AfaI
CTTCCAACT CATTGAGTAT AGTGATTTTG CTACCTCTGC TTGCGTTCCT GCTGCTGAGT GTACAATTTT
8900      8910      8920      8930      8940      8950      8960

                                > < RmaI
                                >< MnlI
                                >< FokI
                                > < MaeI
TAAGGATGCT ATGGGCAAAC CTGTGCCATA TTGTTATGAC ACTAATTTGC TAGAGGGTTC TATTTCTTAT
8970      8980      8990      9000      9010      9020      9030

                                ScrFI >
                                MvaI >
                                MnlI ><
                                EcoRII ><
                                Ecl136I >
                                DsaV ><
                                BstOI >
                                >< NlaIV          BstNI >
                                >< FokI          BsiLI >
                                >< BscBI          ApyI >
                                >< AluI
AGTGAGCTTC GTCCAGACAC TCGTTATGTG CTTATGGATG GTTCCATCAT ACAGTTTCCT AACACTTACC
9040      9050      9060      9070      9080      9090      9100

                                >< RsaI
                                >< SfcI          >< NspI
                                >< ScaI          >< NspHI
                                >< RsaI          >< NlaIII
                                >< Csp6I          >< NlaIII
                                >< AfaI          >< Csp6I
                                >< DdeI          >< AccI   >< AfaI
TGGAGGGTTC TGTTAGAGTA GTAACAACCT TTGATGCTGA GTACTGTAGA CATGGTACAT GCGAAAGGTC
9110      9120      9130      9140      9150      9160      9170

                                >< SstI
                                >< SduI
                                >< SacI
                                NspII ><
                                HgiAI ><
                                Eco24I ><
                                Bsp1286I ><

```

FIGURE 13.21



35/116

```

                                Ecl136II ><>< BmyI
                                BanII ><
                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                Alw21I ><
                                >< BsrI
                                >< AluI
AGAAGTAGGT ATTTGCCTAT CTACCAGTGG TAGATGGGTT CTTAATAATG AGCATTACAG AGCTCTATCA
  9180      9190      9200      9210      9220      9230      9240

                                >< TfiI
                                >< HinfI >< AluI
                                >< MnlI
GGAGTTTTCT GTGGTGTGTA TGCGATGAAT CTCATAGCTA ACATCTTTAC TCCTCTTGTTG CAACCTGTGG
  9250      9260      9270      9280      9290      9300      9310

                                >< MaeIII
                                HphI ><
                                > < BbvI Fnu4HI ><
>< Eco57I
GTGCTTTAGA TGTGTCTGCT TCAGTAGTGG CTGGTGGTAT TATTGCCATA TTGGTGA CTGCTGCCTA
  9320      9330      9340      9350      9360      9370      9380

                                >< RsaI
                                >< Csp6I >< NlaIII
                                >< MaeII
                                >< BbvI
                                >< Fnu4HI
                                >< AflIII
                                >< AfaI>< HphI
                                >< BspWI
CTACTTTATG AAATTCAGAC GTGTTTTTGG TGAGTACAAC CATGTTGTTG CTGCTAATGC ACTTTTGTTT
  9390      9400      9410      9420      9430      9440      9450

                                >< RsaI
                                >< NlaIV
                                >< KpnI
                                >< Eco64I
                                > < ScrFI
                                >< Csp6I
                                > < NciI
                                >< BscBI
                                >< MspI
                                >< Asp718
                                >< HpaII
                                >< BanI >< AluI
                                >< HinfI
                                >< AfaI
                                >< HapII >< PleI
                                >< AccB1I
                                > < BcnI > < DdeI
                                >< Acc65I
                                >< AluI>< DsaV >< AccI
TTGATGTCTT TCACTATACT CTGTCTGGTA CCAGCTTACA GCTTTCTGCC GGGAGTCTAC TCAGTCTTTT
  9460      9470      9480      9490      9500      9510      9520

                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< AfaI >< HphI
                                >< HphI
                                NlaIII ><
ACTTGTACTT GACATTCTAT TTCACCAATG ATGTTTCATT CTTGGCTCAC CTTCAATGGT TTGCCATGTT
  9530      9540      9550      9560      9570      9580      9590

TTCTCCTATT GTGCCTTTTT GGATAACAGC AATCTATGTA TTCTGTATTT CTCTGAAGCA CTGCCATTGG
  9600      9610      9620      9630      9640      9650      9660

                                >< TthHB8I
                                >< RsaI
                                >< MnlI
                                >< MnlI
                                >< Csp6I
                                >< Tru9I
                                >< PleI
                                >< BcgI/a >< TaqI
                                >< MseI
                                >< DdeI
                                >< NlaIII
                                >< BbvI
                                >< Eco57I
                                >< BfrI
                                >< HinfI >< MseI >< MaeIII
                                >< AfaI Fnu4HI ><
TTCTTTAACA ACTATCTTAG GAAAAGAGTC ATGTTTAATG GAGTTACATT TAGTACCTTC GAGGAGGCTG
  9670      9680      9690      9700      9710      9720      9730

                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< BcgI
                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< BsmAI

```

FIGURE 13.22

```

    >< AfaI          >< AfaI          >< Alw26I
CTTTGTGTAC CTTTTTGCTC AACAAAGGAAA TGTACCTAAA ATTGCGTAGC GAGACACTGT TGCCACTTAC
  9740      9750      9760      9770      9780      9790      9800

                                >< NlaIV
                                >< DdeI
                                >< BscBI
                                >< BfrI   AluI ><
ACAGTATAAC AGGTATCTTG CTCTATATAA CAAGTACAAG TATTTTCAGTG GAGCCTTAGA TACTACCAGC
  9810      9820      9830      9840      9850      9860      9870

    >< Fnu4HI
                                >< DdeI
                                >< BfrI
    >< BbvI   >< AluI   >< BbvI          >< DdeI >< AlwNI
TATCGTGAAG CAGCTTGCTG CCACTTAGCA AAGGCTCTAA ATGACTTTAG CAACTCAGGT GCTGATGTTC
  9880      9890      9900      9910      9920      9930      9940

                                >< SfcI
                                >< PstI
                                >< BscCI
TCTACCAACC ACCACAGACA TCAATCACTT CTGCTGTTCT GCAGAGTGGT TTTAGGAAAA TGGCATTCCC
  9950      9960      9970      9980      9990      10000     10010

    >< RsaI
    >< NlaIII
    >< MaeIII
    >< Csp6I
    >< AfaI
GTCAGGCAAA GTTGAAGGGT GCATGGTACA AGTAACCTGT GGAAGTACAA CTCTTAATGG ATTGTGGTTG
  10020     10030     10040     10050     10060     10070     10080

                                XhoII ><
                                Sau3AI ><
                                >< Tru9I   NdeII ><
                                >< NspI     MflI  ><
                                >< NspHI    MboI  ><
                                >< NlaIII   DpnII ><
                                >< MseI     BstYI ><
                                >< MboII   BspAI ><
                                >< BbsI     BglII ><
GATGACACAG TATACTGTCC AAGACATGTC ATTTGCACAG CAGAAGACAT GCTTAATCCT AACTATGAAG
  10090     10100     10110     10120     10130     10140     10150

                                PalI >
                                MscI >
                                HaeIII >
                                EaeI ><
                                BsuRI >
                                BshI >
                                BalI >
>< DpnI >< MboII
>< Bsp143I          >< AluI
ATCTGCTCAT TCGCAAATCC AACCATAGCT TTCTTGTTCA GGCTGGCAAT GTTCAACTTC GTGTTATTGG
  10160     10170     10180     10190     10200     10210     10220

                                >< DdeI> < Tru9I
                                >< BfrI> < MseI
CCATTCTATG CAAAATTGTC TGCTTAGGCT TAAAGTTGAT ACTTCTAACC CTAAGACACC CAAGTATAAA
  10230     10240     10250     10260     10270     10280     10290

    >< ScrFI
    >< MvaI
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
                                >< SphI

```

FIGURE 13.23

37/116

```

    >< DsaV
    >< BstOI
    >< BstNI
    >< BsiLI
    >< ApyI
    >< PaeI
    >< NspI
    >< NspHI
    >< RmaI >< NlaIII
    >< MaeI >< HphI
TTTGTCCGTA TCCAACCTGG TCAAACATTT TCAGTTCTAG CATGCTACAA TGGTTCACCA TCTGGTGTTC
10300      10310      10320      10330      10340      10350      10360

    >< Sau3AI
    >< NdeII
    >< MboI>< NlaIII
    >< DpnII
    >< Eco3II
    >< BsmAI
    >< BsaI>< NlaIII
    >< Alw26I
    >< Tru9I
    >< MseI
    >< Tru9I>< DpnI
    >< MseI >< Bsp143I
    >< BspAI>< AlwI
ATCAGTGTGC CATGAGACCT AATCATACCA TTAAAGGTTC TTTCCTTAAT GGATCATGTG GTAGTGTTCG
10370      10380      10390      10400      10410      10420      10430

    >< Zsp2I
    >< Ppu10I
    >< NsiI>< SfaNI
    >< NdeI
    >< Mph1103I
    >< EcoT22I
    >< AvaIII >< AluI
    >< RsaI >< Csp6I >< AfaI ><
>< Tru9I
>< MseI
TTTTAACATT GATTATGATT GCGTGTCTTT CTGCTATATG CATCATATGG AGCTTCCAAC AGGAGTACAC
10440      10450      10460      10470      10480      10490      10500

    >< SinI
    >< Sau96I
    >< NspIV
    >< NspHII
    >< Eco47I
    >< Cfr13I
    >< BsiZI
    >< Bme18I
    >< AvaII
    >< AsuI>< BsgI
    >< HindII
    >< HincII
    >< BbvI >< BspMI
    >< RsaI >< DdeI
    >< AfaI>< BfrI
    >< SfcI
    >< RsaI >< PstI >< Fnu4HI
    >< Csp6I >< BspWI
    >< AfaI ><
GCTGGTACTG ACTTAGAAGG TAAATTCTAT GGTCCATTTG TTGACAGACA AACTGCACAG GCTGCAGGTA
10510      10520      10530      10540      10550      10560      10570

    >< Tru9I
    >< MseI
    >< BbvI
    >< Fnu4HI
    >< HphI ><
CAGACACAAC CATAACATTA AATGTTTTGG CATGGCTGTA TGCTGCTGTT ATCAATGGTG ATAGGTGTTT
10580      10590      10600      10610      10620      10630      10640

    >< Tru9I
    >< TfiI
    >< MseI
    >< HphI
    >< HinFI
    >< Tru9I
    >< MseI
    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AfaI
TCTTAATAGA TTCACCACTA CTTTGAATGA CTTTAACCTT GTGGCAATGA AGTACAACCTA TGAACCTTTG
10650      10660      10670      10680      10690      10700      10710

    >< SinI
    >< Sau96I
    >< PssI
    >< Psp5II
    >< PpuMI
    >< NspIV
    >< NspHII
    >< NlaIV

```

FIGURE 13. 24

FIGURE 13.25

39/116

```

                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< Esp4I
                                >< Eco57I
                                >< AluI
                                >< AflIII
                                >< AluI
TGGCTGACAC TAGCTTGTCT GGTATAGGC TTAAGGATTG TGTTATGTAT GCTTCAGCTT TAGTTTGTCT
11210      11220      11230      11240      11250      11260      11270

                                >< RmaI
                                >< MaeII
                                >< MaeI
                                >< Fnu4HI
                                >< AflIII
>< BspHI >< AluI >< BbvI >< BspHI >< AluI >< BbvI >< AflIII
TATTCTCATG ACAGCTCGCA CTGTTTATGA TGATGCTGCT AGACGTGTTT GGACACTGAT GAATGTCATT
11280      11290      11300      11310      11320      11330      11340

                                >< Sau96I
                                >< Pali
                                >< NspIV
                                >< NlaIII
                                >< HaeIII
                                >< Sau3AI
                                >< NdeII
                                >< MboI
                                >< DpnII
                                >< DpnI
                                >< Bsp143I
                                >< BspAI>< AluI
                                >< AsuI
                                >< DdeI
                                >< Cfr13I
                                >< BsuRI
                                >< BsiZI
                                >< BshI
                                >< BfrI
>< AccI
ACACTTGTTT ACAAAGTCTA CTATGGTAAT GCTTTAGATC AAGCTATTTC CATGTGGGCC TTAGTTATTT
11350      11360      11370      11380      11390      11400      11410

                                >< RmaI
                                >< NlaIII
                                >< MaeI>< SfcI
                                >< AluI>< AluI
>< MaeIII >< MnlI >< MaeIII >< AluI>< AluI
CTGTAACCTC TAACTATTCT GGTGTCGTTA CGACTATCAT GTTTTATAGCT AGAGCTATAG TGTTTGTGTG
11420      11430      11440      11450      11460      11470      11480

                                >< BsrI
                                >< NlaIII BfrI >
TGTGAGTAT TACCCATTGT TATTTATTAC TGGCAACACC TTACAGTGTA TCATGCTTGT TTATTGTTTC
11490      11500      11510      11520      11530      11540      11550

                                >< Pali
                                >< HaeIII
                                >< Fnu4HI >< BsuRI
                                >< BbvI >< Fnu4HI >< BspWI
                                >< BbvI >< BspWI >< BshI >< Eco57I >< MaeIII
TTAGGCTATT GTTGCTGCTG CTACTTTGGC CTTTTCTGTT TACTCAACCG TTACTTCAGG CTTACTCTTG
11560      11570      11580      11590      11600      11610      11620

                                >< ScrFI
                                >< MvaI
                                >< EcoRII
                                >< Ecl136I
                                >< DsaV
                                >< BstOI
                                >< BstNI
                                >< BsiLI
                                >< BsaJI
                                >< BsaJI
>< Eco31I
>< BsmAI
>< BsaI

```

FIGURE 13. 26

40/116

```

      >< DrdI  >< Alw26I
GTGTTTATGA CTACTTGGTC TCTACACAAG AATTTAGGTA TATGAAGCTCC >< ApyI  DdeI ><
11630      11640      11650      11660      11670      11680      11690

      >< Tru9I
      >< MseI
>< SfaNI      > < HindIII> < Tru9I
  >< MnlI      >< AluI > < MseI  > < MnlI      > < NlaIII
GAGTAGTATT GATGCTTTCA AGCTTAACAT TAAGTTGTTG GGTATTGGAG GTAAACCATG TATCAAGGTT
11700      11710      11720      11730      11740      11750      11760

      >< VneI
      >< SnoI
      >< SduI
      >< NspII
      >< HgiAI
      >< Bsp1286I
      >< BmyI      >< RsaI
      >< RsaI      >< ApaLI      >< MboII
      >< Csp6I      >< Alw44I      >< Csp6I      DdeI >
      >< AfaI      >< MaeII      >< Alw21I      >< AfaI      BfrI >
GCTACTGTAC AGTCTAAAAT GTCTGACGTA AAGTGCACAT CTGTGGTACT GCTCTCGGTT CTTCAACAAC
11770      11780      11790      11800      11810      11820      11830

      >< NspII> < RsaI
      >< DraIII
      >< SduI>< Csp6I
      >< Bsp1286I
      >< MboII
      >< HinfI >< P1eI      >< BmyI > < AfaI      >< MboII
TTAGAGTAGA GTCATCTTCT AAATTGTGGG CACAATGTGT ACAACTCCAC AATGATATTC TTCTTGCAAA
11840      11850      11860      11870      11880      11890      11900

      >< TthHB8I
      >< TaqI
      >< HindIII      >< MboII      SfcI ><
      >< AluI      > < Eco57I      >< NlaIII
AGACACAACCT GAAGCTTTTCG AGAAGATGGT TTCTCTTTTG TCTGTTTTCG TATCCATGCA GGGTGCTGTA
11910      11920      11930      11940      11950      11960      11970

      >< VspI
      >< Tru9I
      >< MseI      >< TthHB8I      > < Ksp632I
      >< AsnI      >< TaqI >< MboII      > < EarI
      >< AseI>< MnlI >< BcgI/a      >< Eco57I      >< Eco57I >< BcgI
GACATTAATA GGTTGTGCGA GGAAATGCTC GATAACCGTG CTACTCTTCA GGCTATTGCT TCAGAAATTTA
11980      11990      12000      12010      12020      12030      12040

      >< StuI
      >< ScrFI
      >< P1eI
      >< MvaI>< HaeIII
      >< EcoRII>< Eco147I
      >< Ecl136I
      >< DsaV >< BsuRI
      >< BstOI
      >< BstNI
      >< BspWI
      >< BsiLI
      >< Fnu4HI      >< BsaJI >< BshI      TfiI ><
      >< NdeI      >< BspWI>< MnlI >< BglI      >< SfcI HinfI ><
      >< AciI      >< ApyI>< AatI      > < AluI

```

FIGURE 13. 27

```

GTTCTTTACC ATCATATGCC GCTTATGCCA CTGCCCAGGA GGCCTATGAG CAGGCTGTAG CTAATGGTGA
12050      12060      12070      12080      12090      12100      12110

    >< XmnI          >< Tru9I                      >< SfaNI
    >< HphI          >< MseI                      >< DdeI
    >< Asp700I       >< Eco57I                    >< BbvI Fnu4HI ><
TTCTGAAGTC GTTCTCAAAA AGTTAAAGAA ATCTTTGAAT GTGGCTAAAT CTGAGTTTGA CCGTGATGCT
12120      12130      12140      12150      12160      12170      12180

                                XhoII ><
                                Sau3AI ><
                                NdeII ><
                                    MnlI >
                                    >< MnlI
                                    >< MflI
                                    >< MboI
                                > < Sau3AI
                                > < NdeII
                                > < MboI
                                > < DpnII
                                    >< DpnI
                                    >< BspWI
                                > < BspAI
                                    >< Bsp143I
                                >< NlaIII
                                >< Bsp143I
                                >< AfaIBglII ><
GCCATGCAAC GCAAGTTGGA AAAGATGGCA GATCAGGCTA TGACCCAAAT GTACAAACAG GCAAGATCTG
12190      12200      12210      12220      12230      12240      12250

                                >< SpeI
                                >< RmaI
                                >< MaeIII
                                >< MaeI
                                >< MboII
                                >< BspWI
                                >< Ksp632I > < HindIII
                                >< DdeI >< SfaNI
                                >< Eam1104I >< BspWI
                                >< EarI>< BfrI >< AluI
AGGACAAGAG GGCAAAAGTA ACTAGTGCTA TGCAAACAAT GCTCTTCACT ATGCTTAGGA AGCTTGATAA
12260      12270      12280      12290      12300      12310      12320

                                >< ThaI
                                >< MvnI
                                >< HinPII
                                >< Hin6I
                                >< HhaI
                                >< CfoI
                                >< BstUI
                                >< Bsp50I
                                >< AccII
                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< AccII
                                SfcI ><
TGATGCACTT AACAACATTA TCAACAATGC GCGTGATGGT TGTGTTCCAC TCAACATCAT ACCATTGACT
12330      12340      12350      12360      12370      12380      12390

                                >< RsaI
                                >< NlaIV
                                >< Eco64I
                                >< Csp6I
                                >< BslI
                                >< BsiYI>< KpnI
                                >< BscBI
                                >< BanI
                                >< Asp718
                                >< AfaI
                                >< NlaIII
                                >< BstXI
                                >< Fnu4HI >< BbvI
                                >< AccB1I
                                >< Acc65I
                                >< MaeIII
                                BsgI ><
ACAGCAGCCA AACTCATGGT TGTTGTCCCT GATTATGGTA CCTACAAGAA CACTTGTGAT GGTAACACCT
12400      12410      12420      12430      12440      12450      12460

                                >< Zsp2I
                                >< Ppu10I

```

FIGURE 13.28

```

    >< NsiI
    >< Mph1103I
    >< NdeI>< EcoT22I
    >< AvaIII >< SfaNI
    >< SfaNI
    >< AciI
    DdeI ><
    BfrI ><
    TTACATATGC ATCTGCACTC TGGGAAATCC AGCAAGTTGT TGATGCGGAT AGCAAGATTG TTCAACTTAG
    12470 12480 12490 12500 12510 12520 12530

    >< Pali
    >< HaeIII >< MnlI >< DdeIDdeI ><
    >< BsuRI >< MaeIII >< BspWI
    >< Tru9I>< NlaIII
    >< MseI>< HphI > < XcmI>< BshI >< AluI BspWI ><
    TGAAATTAAC ATGGACAATT CACCAAATTT GGCTTGGCCT CTTATTGTTA CAGCTCTAAG AGCCAACTCA
    12540 12550 12560 12570 12580 12590 12600

    RsaI ><
    NlaIV ><
    KpnI ><
    >< Fnu4HI
    Eco64I ><
    Csp6I ><
    BscBI ><
    Asp718 ><
    AfaI ><
    >< AciI>< BanI
    AccB1I ><
    >< AluI > < SfcI >< DdeI>< BsrI >< PshAI Acc65I ><
    GCTGTTAAAC TACAGAATAA TGAAGTGAAGT CCAGTAGCAC TACGACAGAT GTCCTGTGCG GCTGGTACCA
    12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670

    >< TthHB8I
    >< TaqI
    >< SfuI
    >< NspV
    >< MnlI
    >< LspI
    >< Csp45I
    >< BstBI
    >< Bsp119I
    >< BsiCI
    >< Bpu14I
    >< AsuII
    CACAAACAGC TTGTACTGAT GACAATGCAC TTGCCTACTA TAACAATTTCG AAGGGAGGTA GGTTTGTGCT
    12680 12690 12700 12710 12720 12730 12740

    >< XhoII
    >< Sau3AI
    >< NdeII
    >< MflI
    >< MboI
    >< DpnII
    >< DpnI
    >< BstYI >< TfiI >< RsaI
    >< BspAI >< RmaI >< Csp6I
    >< Bsp143I >< HinfI >< Csp6I>< RsaI
    >< BglII >< MaeI >< DdeI >< AfaI>< AfaI
    GGCATTACTA TCAGACCACC AAGATCTCAA ATGGGCTAGA TTCCCTAAGA GTGATGGTAC AGGTACAATT
    12750 12760 12770 12780 12790 12800 12810

    >< Sau96I
    >< PssI
    >< Pali
    >< NspIV

```

FIGURE 13.29



43/116

```

                                >< HaeIII
                                >< EcoO109I
                                >< DraII
                                >< Cfr13I
                                >< BsuRI
                                >< BsiZI
                                >< BshI
                                >< AsuI
                                >< SfcI
                                > < MboII
                                MaeII ><
                                >< Fnu4HI >< RsaI
                                >< Eco57I >< Csp6I
                                > < BbsI
                                >< Tru9I
                                >< MseI >< MnlI
                                >< BbvI
                                >< AluI
                                >< AfaI
                                >< RsaI
                                >< SfcI >< Csp6I
                                >< BspWI
                                >< AfaI
                                >< BspMI
                                >< RmaI
                                >< MnlI
                                >< MaeI
                                >< HphI
                                >< SinI
                                >< Sau96I
                                >< NspIV
                                >< NspHII
                                >< NlaIII
                                >< Eco47I
                                >< Eam1105I
                                >< Cfr13I
                                >< BsiZI
                                >< Bme18I >< XcmI
                                >< AvaII
                                >< AsuI> < HinfI
                                >< TfiI
                                >< MaeIII
                                >< NlaIII
                                >< FokI
                                >< HinfI
                                > < RsaI
                                >< MaeII
                                >< Csp6I
                                > < AfaI
                                >< DdeI
                                >< BfrI
                                >< ThaI

```

TACACAGAAC TGGAAACCACC TTGTAGGTTT GTTACAGACA CACCAAAAGG GCCTAAAGTG AAATACTTGT  
 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880

ACTTCATCAA AGGCTTAAAC AACCTAAATA GAGGTATGGT GCTGGGCAGT TTAGCTGCTA CAGTACGTCT  
 12890 12900 12910 12920 12930 12940 12950

TCAGGCTGGA AATGCTACAG AAGTACCTGC CAATTCAACT GTGCTTTCCT TCTGTGCTTT TGCAGTAGAC  
 12960 12970 12980 12990 13000 13010 13020

CCTGCTAAAG CATATAAGGA TTACCTAGCA AGTGGAGGAC AACCAATCAC CAACTGTGTG AAGATGTTGT  
 13030 13040 13050 13060 13070 13080 13090

GTACACACAC TGGTACAGGA CAGGCAATTA CTGTAACACC AGAAGCTAAC ATGGACCAAG AGTCCTTTGG  
 13100 13110 13120 13130 13140 13150 13160

TGGTGCTTCA TGTTGTCTGT ATTGTAGATG CCACATTGAC CATCCAAATC CTAAAGGATT CTGTGACTTG  
 13170 13180 13190 13200 13210 13220 13230

AAAGGTAAGT ACGTCCAAAT ACCTACCACT TGTGCTAATG ACCCAGTGGG TTTTACACTT AGAAACACAG  
 13240 13250 13260 13270 13280 13290 13300

FIGURE 13.30

44/116

```

                                >< SfaNI
                                >< MvnI
                                >< BstUI
                                >< Bsp50I
                                >< AciI
                                >< AccIISfaNI ><
>< RsaI
>< Csp6I
>< AfaI >< AciI                                >< SfcI >< MaeIII
TCTGTACCGT CTGCGGAATG TGGAAAGGTT ATGGCTGTAG TTGTGACCAA CTCCGCGAAC CCTTGATGCA
13310      13320      13330      13340      13350      13360      13370

                                >< Zsp2I
                                > < SfaNI
                                >< Mph1103I>< Tru9I
                                >< Ppu10I>< MaeII                                Fnu4HI ><
                                >< NsiI> < FokI                                BsgI ><
                                >< EcoT22I >< MseI                                >< BbvI
                                >< AciI>< AvaIII >< DraI >< AciI >< Fnu4HI AciI ><
GTCTGCGGAT GCATCAACGT TTTTAAACGG GTTTGCGGTG TAAGTGCAGC CCGTCTTACA CCGTGCGGCA
13380      13390      13400      13410      13420      13430      13440

>< SpeI
>< ScaI
>< RsaI
>< RmaI
>< MaeI
> < Csp6I >< SfcI                                >< BspWI
>< BspWI >< AfaI >< AccI >< BcgI/a BcgI >
CAGGCACTAG TACTGATGTC GTCTACAGGG CTTTTGATAT TTACAACGAA AAAGTTGCTG GTTTTGCAAA
13450      13460      13470      13480      13490      13500      13510

                                >< ScrFI
                                >< MvaI
                                >< MnlI
                                >< EcoRII
                                >< Ecl136I
                                >< BstOI
                                >< BstNI
                                >< BslI
                                >< DsaV >< BsiYI
                                >< BsiLI
                                >< ApyI                                >< PleI
                                > < FokI >< HinfI
GTTCTAAAA ACTAATTGCT GTCGCTTCCA GGAGAAGGAT GAGGAAGGCA ATTTATTAGA CTCTTACTTT
13520      13530      13540      13550      13560      13570      13580

                                >< NlaIII
                                >< Ksp632I
                                >< EarI
                                >< Eam1104I
                                >< BsmAI                                >< Tru9I
                                >< Alw26I                                >< MboII >< MseI
>< Tru9I
>< MseI
>< MnlI
GTAGTTAAGA GGCATACTAT GTCTAACTAC CAACATGAAG AGACTATTTA TAACTTGTTT AAAGATTGTC
13590      13600      13610      13620      13630      13640      13650

                                >< RsaI
                                >< NlaIV
                                > < NlaIII
                                >< KpnI
                                >< HphI
                                > < Eco64I
                                >< Csp6I
                                >< BscBI
                                > < BanI
                                > < Asp718

```

FIGURE 13.31

```

    >< NspBII
    >< AciI
    CAGCGGTTGC TGTCCATGAC TTTTTC AAGT TTAGAGTAGA TGGTGACATG GTACCACATA TATCACGTCA
    13660 13670 13680 13690 13700 13710 13720

    >< MaeIII >< AfaI
    > < AccB1I MaeII ><
    > < Acc65I > < HgaI
    >< MnlI
    >< MaeII
    GCGTCTAACT AAATACACAA TGGCTGATTT AGTCTATGCT CTACGTCATT TTGATGAGGG TAATTGTGAT
    13730 13740 13750 13760 13770 13780 13790

    >< Tru9I
    >< MseI
    ACATTAAAAG AAATACTCGT CACATACAAT TGCTGTGATG ATGATTATTT CAATAAGAAG GATTGGTATG
    13800 13810 13820 13830 13840 13850 13860

    >< ThaI
    >< MvnI
    >< MluI
    >< BstUI
    >< Bsp50I
    >< RsaI
    >< HphI
    >< TfiI
    >< AflIII
    >< DdeI
    >< Csp6I Tru9I ><
    >< HinfI
    >< AccII
    >< BfrI
    >< AfaI MseI ><
    ACTTCGTAGA GAATCCTGAC ATCTTACGCG TATATGCTAA CTTAGGTGAG CGTGACGCC AATCATTATT
    13870 13880 13890 13900 13910 13920 13930

    XhoII >
    Sau3AI >
    NdeII >
    MflI >
    MboI >
    DpnII >
    BstYI >
    BspAI >
    > < SfaNI
    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AfaI
    AAAGACTGTA CAATTCTGCG ATGCTATGCG TGATGCAGGC ATTGTAGGCG TACTGACATT AGATAATCAG
    13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000

    > < ScrFI
    > < MvaI
    >< Fnu4HI
    >< EcoRII
    > < Ecl136I
    > < BstOI
    > < BstNI
    >< Tru9I
    >< MseI
    >< DpnI
    >< Bsp143I
    >< AlwI
    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< BsrI
    >< AfaI
    >< RsaI
    > < HphI
    >< Csp6I
    > < BbvI
    >< AfaI
    >< BslI
    >< BsiYI
    > < BsiLI
    > < ApyI
    >< AfaI
    >< DsaV
    >< AciI
    GATCTTAATG GGAAGTGGTA CGATTTCGGT GATTTCGTAC AAGTAGCACC AGGCTGCGGA GTTCCTATTG
    14010 14020 14030 14040 14050 14060 14070

    >< SfaNI
    >< RmaI
    > < HinfI
    >< MnlI
    >< Fnu4HIpleI ><
    >< TfiI
    >< SfaNI
    >< MamI
    >< BsiBI
    >< MaeI
    >< DdeI
    >< HinfI
    >< FokI
    >< BsaBI
    >< BbvI
    >< BspWI NdeI ><
    TGGATTGATA TTAATCATTG CTGATGCCCA TCCTCACTTT GACTAGGGCA TTGGCTGCTG AGTCCCATAT
    14080 14090 14100 14110 14120 14130 14140

    >< Sau3AI
    >< NdeII

```

FIGURE 13.32

46/116

```

>< MboI
>< MamI
>< DpnII
    >< DpnI
        >< BspWI
    >< BspAI
        >< Bsp143I
    >< BsiBI
    >< BsaBI >< FokI
GGATGCTGAT CTCGCAAAAC CACTTATTAA GTGGGATTTG CTGAAATATG ATTTTACGGA AGAGAGACTT
14150      14160      14170      14180      14190      14200      14210

    > < SniI
    > < Sau96I
    > < NspIV
        >< NspHII
>< TthHB8I
>< TaqI
    >< McrI
    > < Ksp632I
    > < EarI
    > < Eam1104I
    >< BsmAI
>< MboII
    >< BsiEI> < MseI
    >< Alw26I
    >< DraI
    >< FokI
    >< MseI
    >< Tru9I
    >< Bme18I
    >< AvaII
    >< AsuI
    >< MunI
    >< MseI
    >< Tru9I
TGTCTCTTCG ACCGTTATTT TAAATATTGG GACCAGACAT ACCATCCCAA TTGTATTAAC TGTTTGGATG
14220      14230      14240      14250      14260      14270      14280

    SinI ><
    Sau96I ><
    NspIV ><
    NspHII >
    Eco47I ><
    Cfr13I ><
    Bsi2I ><
    Bme18I ><
    AvaII ><
    AsuI ><
    >< FokI
    >< MseI
    >< Tru9I
    >< MseI
ATAGGTGTAT CCTTCATTGT GCAAACTTTA ATGTGTTATT TTCTACTGTG TTTCCACCTA CAAGTTTGG
14290      14300      14310      14320      14330      14340      14350

>< SpeI
>< RmaI
>< MaeI
    >< SspI
    >< BsrI
ACCACTAGTA AGAAAAATAT TTGTAGATGG TGTTCCTTTT GTTGTTCCTCAA CTGGATACCA TTTTCGTGAG
14360      14370      14380      14390      14400      14410      14420

    >< ThaI>< Esp3I
    >< DdeI
    >< BstUI
    >< Bsp50I
    >< BsmBI
    >< MvnI>< BsmAI
    >< HgaI>< AluI
    >< Alw26I
    >< FokI
    >< AccII
    > < BbvI
TTAGGAGTCG TACATAATCA GGATGTAAAC TTACATAGCT CGCGTCTCAG TTTCAAGGAA CTTTTAGTGT
14430      14440      14450      14460      14470      14480      14490

    >< Zsp2I
    >< SphI
>< Ppu10I
    >< PaeI
    >< NspI

```

FIGURE 13.33

```

    >< Sau3AI          >< NspHI
    >< NdeII           >< NsiI
    >< MboI             >< NlaIII
    >< DpnII            >< Mph1103I
    > < DpnI           >< Fnu4HI
    >< Fnu4HI>< BspWI  >< EcoT22I
    >< BspAI           >< BspWI
    > < Bsp143I> < AvaIII > < AlwNI
    >< AlwI            >< AluI      >< AluI >< BbvI >< MaeI
    ATGCTGCTGA TCCAGCTATG CATGCAGCTT CTGGCAATTT ATTGCTAGAT AAACGCACTA CATGCTTTTC
    14500      14510      14520      14530      14540      14550      14560

                                >< ScrFI
                                >< NciI
                                >< MspI
                                >< HpaII
                                >< HapII
    >< Fnu4HI
    >< AlwNI
    >< AluI
    AGTAGCTGCA CTAACAAACA ATGTTGCTTT TCAAAGTGTG AAACCCGGTA ATTTTAATAA AGACTTTTAT
    14570      14580      14590      14600      14610      14620      14630

                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< MboII
                                DdeI ><
                                BbvI ><
    GACTTTGCTG TGTCTAAAGG TTTCTTTAAG GAAGGAAGTT CTGTTGAACT AAAACACTTC TTCTTTGCTC
    14640      14650      14660      14670      14680      14690      14700

                                >< FokI
                                >< Fnu4HI
                                EcoRV ><
                                Eco32I ><
    AGGATGGCAA CGCTGCTATC AGTGATTATG ACTATTATCG TTATAATCTG CCAACAATGT GTGATATCAG
    14710      14720      14730      14740      14750      14760      14770

                                >< VspI
                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< AsnI
                                >< AseI
                                >< MaeIII
    ACAACTCCTA TTCGTAGTTG AAGTTGTTGA TAAATACTTT GATTGTTACG ATGGTGGCTG TATTAATGCC
    14780      14790      14800      14810      14820      14830      14840

    >< Tru9I
    >< MseI
    >< HpaI
    >< HindII
    >< HincII
    >< PvuII
    >< Psp5I
    > < XcmI
    >< Tru9I
    RmaI ><
    >< MseI
    MaeI ><
    AACCAAGTAA TCGTTAACAA TCTGGATAAA TCAGCTGGTT TCCCATTTAA TAAATGGGGT AAGGCTAGAC
    14850      14860      14870      14880      14890      14900      14910

    >< SfaNI
    >< Sau3AI
    >< NdeII
    >< MboI
    >< DpnII
    >< DpnI
    >< Bsp143I
    >< BspAI
    >< AlwI
    >< PleI
    >< Hinfi>< MnlI
    TTTATTATGA CTCAATGAGT TATGAGGATC AAGATGCACT TTTCGCGTAT ACTAAGCGTA ATGTCATCCC
    14920      14930      14940      14950      14960      14970      14980

                                >< ThaI
                                >< MvnI
                                >< BstUI
                                >< Bst1107I
                                >< BspWI
                                >< FokI
                                >< Bsp50I
                                >< AccII>< DdeI
                                >< AccI

                                >< SstI
                                >< SduI
                                >< SacI

```

FIGURE 13.34

48/11.6

```

                                >< NspII
                                >< HgiAI
                                >< Eco24I
                                > < Ecl136II
                                >< Bsp1286I
                                >< BmyI
                                >< BanII
                                >< Alw21I
                                > < AluI
                                >< AluI
TACTATAACT CAAATGAATC TTAAGTATGC CATTAGTGCA AAGAATAGAG CTCGCACCGT AGCTGGTGTC
    14990      15000      15010      15020      15030      15040      15050

                                RmaI ><
                                > < MnlI
                                MaeI ><
                                >< Fnu4HI
                                >< AciI
TCTATCTGTA GTACTATGAC AAATAGACAG TTTCATCAGA AATTATTGAA GTCAATAGCC GCCACTAGAG
    15060      15070      15080      15090      15100      15110      15120

                                >< Tru9I
                                >< MseI
GAGCTACTGT GGTAATTGGA ACAAGCAAGT TTTACGGTGG CTGGCATAAT ATGTTAAAAA CTGTTTACAG
    15130      15140      15150      15160      15170      15180      15190

                                NspI ><
                                NspHI ><
                                NlaIII ><
                                >< NlaIII
                                DdeI ><
                                BspWI ><
                                >< MaeIII
                                BfrI ><
TGATGTAGAA ACTCCACACC TTATGGGTTG GGATTATCCA AAATGTGACA GAGCCATGCC TAACATGCTT
    15200      15210      15220      15230      15240      15250      15260

                                > < Pali
                                > < HaeIII
                                > < BsuRI
                                > < BshI
                                >< MnlI
                                >< MaeIII
                                SfcI ><
AGGATAATGG CCTCTCTTGT TCTTGCTCGC AAACATAACA CTTGCTGTAA CTTATCACAC CGTTTCTACA
    15270      15280      15290      15300      15310      15320      15330

                                Tru9I ><
                                ScrFI >
                                MvaI >
                                >< MseI
                                FokI ><
                                EcoRII ><
                                Ecl136I >
                                DsaV ><
                                BstOI >
                                BstNI >
                                >< NlaIII
                                > < Fnu4HI
                                BsiLI >
                                >< AciI
                                ApyI >
                                >< AluI
                                >< AviII >< MseI
                                >< AciI
GGTTAGCTAA CGAGTGTGCG CAAGTATTAA GTGAGATGGT CATGTGTGGC GGCTCACTAT ATGTTAAACC
    15340      15350      15360      15370      15380      15390      15400

                                > < SfaNI
                                >< MspI
                                >< HpaII
                                >< HapII
                                >< HphI
                                >< BspWI
                                >< Tru9I
                                MaeIII ><
                                >< MseI
                                AluI ><

```

FIGURE 13.35

```

AGGTGGAACA TCATCCGGTG ATGCTACAAC TGCTTATGCT AATAGTGTCT TTAACATTTG TCAAGCTGTT
15410      15420      15430      15440      15450      15460      15470

>< BspWI                                     >< DrdI
ACAGCCAATG TAAATGCACT TCTTTCAACT GATGGTAATA AGATAGCTGA CAAGTATGTC CGCAATCTAC
15480      15490      15500      15510      15520      15530      15540

                                     >< AluI      > < AciI
                                     >< Sau3AI
                                     >< NdeII
                                     >< MboI
> < MamI
  >< FbaI
>< DpnII
  >< DpnI
  >< BspHI
>< BspAI
  >< Bsp143I
>< BsiQI
      >< SfcI      > < BsiBI>< NlaIII
      >< BsmAI      > < BsaBI>< FokI
      >< Alw26I      >< BclI>< EcoRI      FokI ><
AACACAGGCT CTATGAGTGT CTCTATAGAA ATAGGGATGT TGATCATGAA TTCGTGGATG AGTTTTACGC
15550      15560      15570      15580      15590      15600      15610

      >< TfiI
      >< SfaNI
      >< NlaIII
      >< HinfI
      >< BspMI      >< MaeIII
TTACCTGCGT AAACATTTCT CCATGATGAT TCTTTCTGAT GATGCCGTTG TGTGCTATAA CAGTAACTAT
15620      15630      15640      15650      15660      15670      15680

      > < RmaI
      >< NheI >< Tru9I
>< Fnu4HI      > < MaeI      >< Tru9I
>< AciI      >< AluI >< MseI      >< MseI      MnlI ><
GCGGCTCAAG GTTTAGTAGC TAGCATTAAG AACTTTAAGG CAGTTCTTTA TTATCAAAAT AATGTGTTCA
15690      15700      15710      15720      15730      15740      15750

                                     >< SinI
                                     >< Sau96I
                                     >< PssI
                                     >< Psp5II
                                     >< PpuMI
                                     >< NspIV
                                     >< NspHII
                                     >< Eco0109I
                                     >< Eco47I
                                     >< DraII
                                     >< Cfr13I
                                     >< BsiZI
                                     >< Bmel8I
                                     >< AvaII
                                     >< AsuI      >< MnlI
>< NlaIII      >< BsmAI      >< DdeI
  >< DdeI      >< Alw26I
TGTCTGAGGC AAAATGTTGG ACTGAGACTG ACCTTACTAA AGGACCTCAC GAATTTTGCT CACAGCATAC
15760      15770      15780      15790      15800      15810      15820

                                     >< XhoII
                                     >< Sau3AI
                                     >< NdeII
                                     >< MflI
                                     >< MboI

```

FIGURE 13. 36

```

                >< RsaI                >< DpnII
                >< MaeII                >< DpnI
                >< Csp6I                >< BstYI
                >< BsaAI                >< BspMI
                >< AflIII                >< BspAI
                >< AfaI                >< AlwI>< Bsp143I
                >< AfaI                >< AfaI
AATGCTAGTT AAACAAGGAG ATGATTACGT GTACCTGCCT TACCCAGATC CATCAAGAAT ATTAGGCGCA
15830      15840      15850      15860      15870      15880      15890

                >< RsaI                >< SfaNI
                >< Csp6I                >< MaeIII
                >< AfaI                >< BsrI ><
GGCTGTTTTG TCGATGATAT TGTCAAAACA GATGGTACAC TTATGATTGA AAGGTTTCGTG TCACTGGCTA
15900      15910      15920      15930      15940      15950      15960

> < FokI
>< BspWI
TTGATGCTTA CCCACTTACA AAACATCCTA ATCAGGAGTA TGCTGATGTC TTTCACCTGT ATTTACAATA
15970      15980      15990      16000      16010      16020      16030

                >< Van91I
                >< PflMI
                >< NspI
                > < PalI>< NspHI
                > < MscI>< NlaIII
                > < HaeIII
                > < BsuRI
                >< BsrI
                >< EaeI >< BslI >< NspI
                > < BshI>< BsiYI >< NspHI
                >< NlaIII                >< AflIII >< AflIII
                >< MaeIII                >< AluI > < BalI>< AccB7I >< NlaIII
CATTAGAAAG TTACATGATG AGCTTACTGG CCACATGTTG GACATGTATT CCGTAATGCT AACTAATGAT
16040      16050      16060      16070      16080      16090      16100

                >< RsaI> < NlaIV
                >< MnlI
                >< Csp6I >< DdeI                >< RsaI
                >< BsrI >< MnlI                >< Csp6I
                >< AfaI> < BscBI                >< AfaI                SfcI ><
AACACCTCAC GGTACTGGGA ACCTGAGTTT TATGAGGCTA TGTACACACC ACATACAGTC TTGCAGGCTG
16110      16120      16130      16140      16150      16160      16170

                >< NlaIV
                >< EcoNI
                >< Eco31I
                >< Eco64I>< BsmAI
                >< BscBI >< BslI
                >< BanI >< BsiYI
                >< AciI >< BsaI
                >< AccB1I>< Alw26I BbvI ><
TAGGTGCTTG TGTATTGTGC AATTACACAGA CTTCACTTCG TTGCGGTGCC TGTATTAGGA GACCATTCTT
16180      16190      16200      16210      16220      16230      16240

                >< Tth111I
                >< Fnu4HI >< NlaIII                > < Tru9I
                >< BspWI >< AspI                > < MseI
ATGTTGCAAG TGCTGCTATG ACCATGTCAT TTCAACATCA CACAAATTAG TGTTGTCTGT TAATCCCTAT
16250      16260      16270      16280      16290      16300      16310

                >< ScrFI
                >< MvaI

```

FIGURE 13. 37



```

>< EcoRII
>< Ecl136I
>< DsaV
>< BstOI
>< BstNI
>< BsiLI
>< BsaJI
>< ApyI
>< MaeIII >< MaeIII
>< MaeI
>< RmaI
>< MnlI
>< BspWI ><
>< AluI
GTTTGCAATG CCCAGGTTG TGATGTCAC TATGTGACAC AACTGTATCT AGGAGGTATG AGCTATTATT
16320 16330 16340 16350 16360 16370 16380

>< MaeIII >< MnlI
GCAAGTCACA TAAGCCTCCC ATTAGTTTTT CATTATGTGC TAATGGTCAG GTTTTTGGTT TATACAAAAA
16390 16400 16410 16420 16430 16440 16450

>< NspI
>< NspHI > < Tth111I
>< NlaIII>< MaeIII>< MaeIII
>< AflIII >< AspI
>< AflIII
CACATGTGTA GGCAGTGACA ATGTCAC TTTCAATGCG ATAGCAACAT GTGATTGGAC TAATGCTGGC
16460 16470 16480 16490 16500 16510 16520

>< RsaI
>< P1eI
>< DdeI
>< Csp6I
>< BsmAI >< HinfI
>< Alw26I >< HindIII
>< AfaI >< AluI >< Fnu4HI >< BbvI
GATTACATAC TTGCCAACAC TTGTACTGAG AGACTCAAGC TTTTCGCAGC AGAAACGCTC AAAGCCACTG
16530 16540 16550 16560 16570 16580 16590

> < ThaI
>< ScaI
>< RsaI >< RsaI
> < MvnI
>< Csp6I >< Csp6I
> < BstUI
> < Bsp50I
> < Tru9I
> < MseI > < NdeI
>< AfaI >< AfaI
> < AccII
AGGAAACATT TAAGCTGTCA TATGGTATTG CCACTGTACG CGAAGTACTC TCTGACAGAG AATTGCATCT
16600 16610 16620 16630 16640 16650 16660

MaeIII ><
>< MaeIII
>< EcoO65I
>< Eco9II
>< BstPI
>< BstEII
>< BsrI

>< SfaNI >< RmaI
>< NlaIII >< MaeI
TTCATGGGAG GTTGGAAAAC CTAGACCACC ATTGAACAGA AACTATGTCT TTACTGGTTA CCGTGTAAC T
16670 16680 16690 16700 16710 16720 16730

RsaI ><
>< MnlI
>< HphI
>< RsaI
>< RsaI
>< Csp6I >< Csp6I
>< AfaI >< AfaI
>< SfaNI >< SfaNI
>< MaeIII >< HphI AfaI ><
AAAAATAGTA AAGTACAGAT TGGAGAGTAC ACCTTTGAAA AAGGTGACTA TGGTGATGCT GTTGTGTACA
16740 16750 16760 16770 16780 16790 16800

```

FIGURE 13. 38

```

>< RsaI
>< Csp6I
>< AfaI
GAGGTACTAC GACATACAAG TTGAATGTTG GTGATTACTT TGTGTTGACA TCTCACACTG TAATGCCACT
16810      16820      16830      16840      16850      16860      16870

>< VneI
>< SnoI
  >< SduI
  >< NspII
  >< HgiAI
>< DraIII
  >< Bsp1286I
  >< BmyI
  >< ApaLI
  >< Alw44I
  >< Alw21I
  >< RmaI
  >< MaeI
  >< BspWI
  >< DraIII
  >< RsaI
  >< Csp6I
  >< BsrI
  >< AfaI
  >< DdeI
TAGTGCACCT ACTCTAGTGC CACAAGAGCA CTATGTGAGA ATTACTGGCT TGTACCCAAC ACTCAACATC
16880      16890      16900      16910      16920      16930      16940

  >< StyI
  >< SinI
  >< Sau96I
  >< NspIV
  >< EcoT14I
  >< Eco47I
  >< Eco130I
  >< ScaI
  >< Cfr13I
  >< BssT1I
  >< SphI
  >< PaeI
  >< NlaIII
  >< NspI
  >< NspHI
  >< RsaI
  >< BsaJI
  >< Bme18I
  >< Csp6I
  >< AfaI
  >< BsiZI
  >< AvaII
  >< AsuI
TCAGATGAGT TTTCTAGCAA TGTGCAAAT TATCAAAAGG TCGGCATGCA AAAGTACTCT ACACTCCAAG
16950      16960      16970      16980      16990      17000      17010

  >< ScrFI
  >< RsaI
  >< MvaI
  >< EcoRII
  >< Ecl136I
  >< Csp6I
  >< BstOI
  >< BstNI
  >< XcmI
  >< BslI
  >< NspHII
  >< BsiYI
  >< BsiLI
  >< ApyI
  >< BsrI
  >< DsaV
  >< AfaI
  >< HinfI
  >< PleI
GACCACCTGG TACTGGTAAG AGTCATTTTG CCATCGGACT TGCTCTCTAT TACCCATCTG CTCGCATAGT
17020      17030      17040      17050      17060      17070      17080

  >< SfaNI
  >< SphI
  >< PaeI
  >< NspI
  >< NspHI
  >< SphI
  >< PvuII
  >< Psp5I
  >< NspBII
  >< Fnu4HI
  >< NlaIII
  >< AluI
  >< BbvI
  >< MseI
  >< Tru9I
  >< SspI
  >< Bst1107I
  >< AccI
  >< NlaIII
  >< BspWI
  >< BbvI
  >< MseI
  >< Tru9I
  >< SspI
GTATACGGCA TGCTCTCATG CAGCTGTTGA TGCCCTATGT GAAAAGGCAT TAAAATATTT GCCCATAGAT
17090      17100      17110      17120      17130      17140      17150

```

FIGURE 13.39

```

> < ThaI
>< ThaI
> < MvnI
>< MvnI >< ThaI
> < HinPII
>< HinPII
>< HinPII >< MvnI
> < Hin6I
>< Hin6I
> < HhaI
>< HhaI >< HhaI
> < CfoI
>< CfoI >< CfoI
> < BstUI
>< BstUI >< BstUI
>< BssHII
>< BspMI
> < Bsp50I
>< Bsp50I>< Bsp50I
>< TfiI >< Hin6I> < AccII
>< HinfI >< AccII >< AccII
>< EcoRI
AAATGTAGTA GAATCATACC TGC GCGTGCG CGCGTAGAGT GTTTGTGATAA ATTCAAAGTG AATTCAACAC
17160 17170 17180 17190 17200 17210 17220

>< Zsp2I
>< Ppu10I
>< NsiI
>< Mph1103I
>< EcoT22I
>< BsgI > < AvaIII >< DrdI
TAGAACAGTA TGTTTTCTGC ACTGTAAATG CATTGCCAGA AACAACTGCT GACATTGTAG TCTTTGATGA
17230 17240 17250 17260 17270 17280 17290

>< RmaI
>< MaeI >< MaeII
AATCTCTATG GCTACTAATT ATGACTTGAG TGTTGTCAAT GCTAGACTTC GTGCAAAACA CTACGTCTAT
17300 17310 17320 17330 17340 17350 17360

>< Sau3AI
>< NdeII
>< MboI
>< DpnII
>< DpnI
>< BspAI
>< AlwI>< Bsp143I > < AciI >< RmaI
>< MaeI SspI ><
ATTGGCGATC CTGCTCAATT ACCAGCCCC CGCACATTGC TGACTAAAGG CACACTAGAA CCAGAATATT
17370 17380 17390 17400 17410 17420 17430

>< SinI
>< Sau96I
>< NspIV >< StyI
>< NspHII >< NspI
>< Eco47I >< NspHI
>< Cfr13I >< NlaIII
>< BsiZI >< EcoT14I
>< BsgI >< Eco130I
>< Bme18I >< BssT1I
>< AvaII >< BsaJI
>< AsuI> < AflIII
TTAATTCAGT GTGCAGACTT ATGAAAACAA TAGGTCCAGA CATGTTTCCTT GGAAGTTGTC GCCGTTGTCC
17440 17450 17460 17470 17480 17490 17500

```

FIGURE 13. 40

```

                >< HindII
                >< HincII
            TGCTGAAATT GTTGACACTG TGAGTGCTTT AGTTTATGAC AATAAGCTAA AAGCACACAA GGATAAGTCA
                17510         17520         17530         17540         17550         17560         17570

>< AluI
GCTCAATGCT TCAAATGTT CTACAAAGGT GTTATTACAC >< NlaIII ATCTGCAATC AACAGACCTC
    17580         17590         17600         17610         17620         17630         17640

                >< MnlI
>< EcoNI
    >< BslI
    >< BsiYI
AAATAGGCGT TGTAAGAGAA TTTCTTACAC GCAATCCTGC TTGGAGAAAA >< HphI >< AluI
    17650         17660         17670         17680         17690         17700         17710

                >< SfcI                >< DdeI                >< TfiI
                > < AluI                >< BfrI                >< HinfI
TAATTCACAG AACGCTGTAG CTTCAAAAAT CTTAGGATTG CCTACGCAGA CTGTTGATTC ATCACAGGGT
    17720         17730         17740         17750         17760         17770         17780

                >< Tth111I
                >< AspI
TCTGAATATG ACTATGTCAT ATTCACACAA ACTACTGAAA CAGCACACTC TTGTAATGTC AACCGCTTCA
    17790         17800         17810         17820         17830         17840         17850

                > < HindII
                > < HincII
                >< AciI
                >< XhoII
                >< Sau3AI
                >< NdeII
                >< MflI
                >< MboI
                >< MamI
                >< DpnII
                >< DpnI
                >< BstYI
                >< BspAI
                >< Bsp143I
                >< BsiBI
                >< BsaBI
                >< BglII
                >< BspWI
ATGTGGCTAT CACAAGGGCA AAAATTGGCA TTTTGTGCAT AATGTCTGAT AGAGATCTTT ATGACAAACT
    17860         17870         17880         17890         17900         17910         17920

                >< XbaI
                >< RmaI
                >< MaeI                >< MaeII                >< MaeIII
                >< BsrI ><
GCAATTTACA AGTCTAGAAA TACCACGTCG CAATGTGGCT ACATTACAAG CAGAAAATGT AACTGGACTT
    17930         17940         17950         17960         17970         17980         17990

                >< Sau3AI
                >< NdeII
                >< MboII
                >< MboI
                > < FokI
                >< DpnII
                >< DpnI
                >< BspAI
                >< Bsp143I
                >< BbsI > < BsrI
                >< NlaIV
                >< Eco64I
                >< BscBI
                >< BanI
                >< AccB1I
                >< DdeI
>< Tru9I
>< MseI>< SfcI

```

FIGURE 13. 41

FIGURE 13.42

```

TGTGACACT GAAAATAACA CAGAATTCAC CAGAGTTAAT GCAAAACCTC CACCAGGTGA CCAGTTTAAA
18350      18360      18370      18380      18390      18400      18410

      >< ScrFI
      >< MvaI
      >< EcoRII
      >< Ecl136I
      >< DsaV
      >< BstOI
      >< BstNI
      >< BsiLI
      >< BsaJI
      >< NlaIII
      >< ApyI
      >< RsaI
      >< DdeI ><
      >< Tru9I>< Csp6I
      >< MseI >< AfaI
CATCTTATAC CACTCATGTA TAAAGGCTTG CCCTGGAATG TAGTGCGTAT TAAGATAGTA CAAATGCTCA
18420      18430      18440      18450      18460      18470      18480

      >< NlaIII
      >< HinPII
      >< Tth111I
      >< Hin6I
      >< HinfI
      >< AspI
      >< P1eI
      >< HhaI
      >< CfoI
      >< AluI
GTGATACACT GAAAGGATTG TCAGACAGAG TCGTGTTTCGT CCTTTGGGCG CATGGCTTTG AGCTTACATC
18490      18500      18510      18520      18530      18540      18550

      >< SinI
      >< Sau96I
      >< NspIV
      >< NspHII
      >< Eco47I
      >< Cfr13I
      >< ScaI
      >< BsiZI
      >< RsaI
      >< Bme18I
      >< Csp6I
      >< AvaII
      >< MaeII
      >< AfaI
      >< AsuI
      >< AflIII
      >< MaeIII>< MaeII
AATGAAGTAC TTTGTCAAGA TTGGACCTGA AAGAACGTGT TGTCTGTGTG ACAAACGTGC AACTTGCTTT
18560      18570      18580      18590      18600      18610      18620

      >< TfiI
      >< Tth111I
      >< HinfI
      >< AspI
TCTACTTCAT CAGATACTTA TGCCTGCTGG AATCATTCTG TGGGTTTGA CTATGTCTAT AACCCATTTA
18630      18640      18650      18660      18670      18680      18690

      >< ScrFI
      >< RsaI ><
      >< MvaI
      >< EcoRII
      >< Ecl136I ><
      >< DsaV
      >< Csp6I ><
      >< BstXI ><
      >< MaeIII
      >< EcoO651
      >< Eco91I
      >< BstPI
      >< ApyI
      >< Eco57I>
      >< BstEII
      >< MaeIII
      >< NlaIII
      >< AfaI ><
TGATTGATGT TCAGCAGTGG GGCTTTACGG GTAACCTTCA GAGTAACCAT GACCAACATT GCCAGGTACA
18700      18710      18720      18730      18740      18750      18760

      >< SfaNI
      >< RmaI
      >< NspI
      >< NspHI

```

FIGURE 13.43

```

    >< NlaIII
    >< MaeI
>< NlaIII >< BspWI
    > < AflIII
TGGAAATGCA CATGTGGCTA GTTGTGATGC TATCATGACT AGATGTTTAG CAGTCCATGA GTGCTTTGTT
    18770      18780      18790      18800      18810      18820      18830

    >< ThaI
    >< MvnI
>< HinPII
>< Hin6I
    >< HhaI
    >< CfoI
    >< BstUI
    >< Bsp50I
    >< AccII
AAGCGCGTTG ATTGGTCTGT TGAATACCTT ATTATAGGAG ATGAACTGAG GGTTAATTCT GCTTGCAGAA
    18840      18850      18860      18870      18880      18890      18900

    >< RsaI
    >< Csp6I
    >< AfaI
AAGTACAACA CATGGTTGTG AAGTCTGCAT TGCTTGCTGA TAAGTTTCCA GTTCTTCATG ACATTGGAAA
    18910      18920      18930      18940      18950      18960      18970

    >< MboII
    > < NlaIII
    >< BspWI
    >< BsrI
    >< BspHI
    >< BsiYI
    >< DdeI
    >< MseI
    >< EcoNI
    >< MnlI
    >< BslI
    >< BsiYI
    >< DdeI
    >< MseI
    >< Eco57I
    >< MaeIII
    >< DdeI
    >< CelII
    >< Bpu1102I
    >< AocI
    >< MnlI
    >< SfaNI
    >< Bpu1102I
TCCAAAGGCT ATCAAGTGTG TGCCTCAGGC TGAAGTAGAA TGGAAAGTCT ACGATGCTCA GCCATGTAGT
    18980      18990      19000      19010      19020      19030      19040

    >< MnlI
    >< Ksp632I
    >< HindIII
    >< EarI
    >< AluI
    >< MboII
    >< Eam1104I
GACAAAGCTT ACAAATAGA GGAAGTCTTC TATTCTTATG CTACACATCA CGATAAATTC ACTGATGGTG
    19050      19060      19070      19080      19090      19100      19110

    >< Sau3AI
    >< NdeII
    >< MboI
    >< MaeII
    >< MaeIII
    >< DpnII
    >< DpnI
    >< BspAI
    >< MaeIII
    >< Bsp143I
    >< MunI
    >< HinfI
    >< DrdI
TTTGTTTGTT TTGGAATGT AACGTTGATC GTTACCCAGC CAATGCAATT GTGTGTAGGT TTGACACAAG
    19120      19130      19140      19150      19160      19170      19180

    >< ScrFI
    >< MvaI
    >< EcoRII
    >< Zsp2I
    >< SphI
    > < Ppu10I
    >< PaeI
    >< NspI
    >< NspHI
    >< NlaIII
    >< Mph1103I

```

FIGURE 1344

58/116.

```

                >< Ecl136I
            >< DsaV
                >< BstOI
                >< BstNI
                >< BsiLI
                >< ApyI
    >< PleI
AGTCTTGTCA AACTTGAAC TACCAGGCTG TGATGGTGGT AGTTTGTATG TGAATAAGCA TGCATTCCAC
  19190      19200      19210      19220      19230      19240      19250

                >< Tru9I
                > < MunI
    >< TthHB8I
    >< BcgI/a >< TaqI
    >< AluI
    >< MseI
    >< DraI
    >< BcgI
ACTCCAGCTT TCGATAAAAG TGCATTTACT AATTTAAAGC AATTGCCTTT CTTTTACTAT TCTGATAGTC
  19260      19270      19280      19290      19300      19310      19320

                >< PleI
                >< NlaIII
                >< BsmAI
    >< HinfI>< Alw26I
    >< SfaNI ><
    >< MaeII
    >< BsaAI ><
    >< AflIII ><
CTTGTGAGTC TCATGGCAAA CAAGTAGTGT CGGATATTGA TTATGTTCCA CTCAAATCTG CTACGTGTAT
  19330      19340      19350      19360      19370      19380      19390

                Zsp2I >
                >< ScaI
                Ppu10I ><
                >< RsaINsiI >
                Mph1103I >
                >< SfaNIEcoT22I >
                > < RsaI >< Csp6I
                >< Csp6I
                >< NlaIII> < AfaI >< AfaI
                >< AvaIII ><
TACACGATGC AATTTAGGTG GTGCTGTTTG CAGACACCAT GCAAATGAGT ACCGACAGTA CTTGGATGCA
  19400      19410      19420      19430      19440      19450      19460

    >< FokI
TATAATATGA TGATTTCTGC TGGATTTAGC CTATGGATTT ACAAACAATT TGATACTTAT AACCTGTGGA
  19470      19480      19490      19500      19510      19520      19530

    >< ScrFI
    >< MvaI
    >< MaeIII
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    >< DsaV
    >< BstOI
    >< BstNI
    >< BsiLI
    >< ApyI
    >< Tru9I
    >< MseI
ATACATTTAC CAGGTTACAG AGTTTAGAAA ATGTGGCTTA TAATGTTGTT AATAAAGGAC ACTTTGATGG
  19540      19550      19560      19570      19580      19590      19600

    >< SgrAI
    >< NaeI
    >< MspI
    >< HpaII
    >< HapII
    >< Cfr10I
    >< BspWI
    > < VspI
    > < Tru9I
    > < MseI
    > < AsnI
    > < AseI
ACACGCCGGC GAAGCACCTG TTTCCATCAT TAATAATGCT GTTTACACAA AGGTAGATGG TATTGATGTG
  19610      19620      19630      19640      19650      19660      19670

```

FIGURE 13. 45



FIGURE 13.46

```

>< AccI                               >< Alw26I >< BfrIMseI ><
AAAGTAGACG GCATTATTCA ACAGTTGCCT GAAACCTACT TTA CTCAGAG CAGAGACTTA GAGGATTTTA
20100      20110      20120      20130      20140      20150      20160

                                >< TthHB8I
                                >< TaqI
                                    >< SstI
                                    >< SduI
                                    >< SacI
                                > < PaeR7I
                                > < NspIII
                                    >< NspII
                                    >< HgiAI
                                > < Eco88I
                                > < XhoI>< Eco24I
                                    >< Ecl136II
                                > < SlaI>< Bsp1286I
                                > < CcrI>< BmyI
                                > < BcoI>< BanII
                                > < Ama87I
                                > < AvaI>< Alw21I
                                >< AluI
                                >< EcoRI
                                >< FokIALuI ><
XcmI
>< Sau3AI
>< NdeII
>< MboI
>< DpnII
>< DpnI
>< BspAI
>< Bsp143I
AGCCCAGATC ACAAATGGAA ACTGACTTTC TCGAGCTCGC TATGGATGAA TTCATACAGC GATATAAGCT
20170      20180      20190      20200      20210      20220      20230

                                >< TthHB8I
                                >< TaqI
                                >< SfuI
                                >< NspV
                                >< LspI
                                >< Csp45I
                                >< BstBI
                                >< Bsp119I
                                >< BsiCI
                                >< Bpu14I
                                >< AsuII
                                >< BcgI
                                >< MboII
                                >< BbsI
                                >< Tru9I ><
                                >< NlaIII
                                >< AciIMseI ><
CGAGGGCTAT GCCTTCGAAC ACATCGTTTA TGGAGATTTC AGTCATGGAC AACTTGGCGG TCTTCATTTA
20240      20250      20260      20270      20280      20290      20300

                                >< HphI
                                >< HinPII
                                >< Hin6I
                                >< EspI
                                > < HhaI >< TfiI
                                >< DdeI
                                >< HaeII
                                >< CelII
                                >< Eco47III
                                >< Tru9I
                                >< Bpu1102I > < CfoI >< HinfI
                                >< MseI
                                >< BfrI
                                >< Bsp143II
                                >< MnlI
ATGATAGGCT TAGCCAAGCG CTCACAAGAT TCACCACTTA AATTAGAGGA TTTTATCCCT ATGGACAGCA
20310      20320      20330      20340      20350      20360      20370

                                >< MstI
                                >< HinPII
                                >< Hin6I
                                >< HhaI
                                >< EspI
                                >< FdiII
                                >< CfoI
                                >< SfaNI
                                >< AviII
                                >< Sau3AI ><
                                >< NdeII ><
                                >< MboI ><
                                >< DpnII ><
                                >< DpnI ><
                                >< BspAI ><
                                >< Bsp143I ><
CAGTGAAAAA TTA CTTCATA ACAGATGCGC AAACAGGTTC ATCAAAATGT GTGTGTTCTG TGATTGATCT
20380      20390      20400      20410      20420      20430      20440

                                >< TthHB8I

```

FIGURE 13.47

61/116

```

      >< Tth111I
      >< TaqI
    >< AspI      > < MaeIII      MaeIII ><
TTTACTTGAT GACTTTGTCG AGATAATAAA GTCACAAGAT TTGTCAGTGA TTTCAAAAGT GGTCAAGGTT
  20450      20460      20470      20480      20490      20500      20510

                                >< NspI
                                >< NspHI
                                >< NlaIII
                                >< FokI
    >< MunI      > < NlaIII      >< AflIII
ACAATTGACT ATGCTGAAAT TTCATTCATG CTTTGGTGTA AGGATGGACA TGTGAAACC TTCTACCCAA
  20520      20530      20540      20550      20560      20570      20580

                                >< SfaNI
                                >< ScrFI
                                >< MvaI
                                >< EcoRII
                                >< Ecl136I
                                >< DsaV
                                >< BstOI      >< SfaNI
                                >< BstNI      >< RsaI      BspWI ><
                                >< BsiLI      > < Csp6I      BsmI >
                                >< ApyI      >< AfaI      BscCI ><
    >< BspWI
AACTACAAGC AAGTCAAGCG TGGCAACCAG GTGTTGCGAT GCCTAACTTG TACAAGATGC AAAGAATGCT
  20590      20600      20610      20620      20630      20640      20650

    >< Eco57I >< MaeIII      >< HphI
TCTTGAAAAG TGTGACCTTC AGAATTATGG TGAAAATGCT GTTATACCAA AAGGAATAAT GATGAATGTC
  20660      20670      20680      20690      20700      20710      20720

                                > < RsaI
                                >< Csp6I
    >< Bst1107I      >< Tru9I      >< AluI
    >< AccI      >< MseI      > < AfaINlaIII ><
GCAAAGTATA CTCAACTGTG TCAATACTTA AATACACTTA CTTTAGCTGT ACCCTACAAC ATGAGAGTTA
  20730      20740      20750      20760      20770      20780      20790

                                >< ScrFI
                                >< RsaI
                                >< MvaI
                                >< EcoRII >< NspBII
                                >< Ecl136I      >< SduI
                                > < Csp6I      >< NspII
                                >< BstOI >< PvuII>< HgiAI
                                >< BstNI      >< DdeI
                                >< BsiLI >< Psp5I>< Bsp1286I
                                >< ApyI >< AluI >< BmyI
                                >< DsaV>< AfaI      >< Alw21I
TTCACCTTTGG TGCTGGCTCT GATAAAGGAG TTGCACCAGG TACAGCTGTG CTCAGACAAT GGTGCGCAAC
  20800      20810      20820      20830      20840      20850      20860

                                >< XhoII
                                >< Tru9I
                                >< Sau3AI
                                >< NdeII
    >< TthHB8I >< MseI
                                >< MflI
                                >< MboI
                                >< MamI
                                >< DpnII
    >< TfiI >< DpnI

```

FIGURE 13. 48

```

                >< BstYI                > < TfiI
                >< BspAI                > < HinfI
                >< HinfI>< Bsp143I        >< Esp3I        >< Tru9I
                >< BsiBI        >< Tth111I    >< BsmBI        >< MseI
                >< BsaBI        >< BsmAI        > < BsmAI
    >< BsrI        >< TaqI    >< BglII    >< AspI        >< Alw26I    >< HgaI> < Alw26I
TGGCACACTA CTTGTCGATT CAGATCTTAA TGACTTCGTC TCCGACGCAG ATTCTACTTT AATTGGAGAC
    20870        20880        20890        20900        20910        20920        20930

                >< StyI
                >< SinI
                >< Sau96I
                > < SinI
                > < Sau96I
                >< PssI
                >< Psp5II
                > < PpuMI
                > < NspIV
                >< NspHII
                >< NlaIV
                > < EcoO109I
                > < Eco47I
                > < DraII
                > < Cfr13I
                >< BsiZI
                >< BscBI
                > < Bme18I
                > < AvaII
                > < Csp6I
                >< AfaI
                > < AsuI
                >< Bme18I
                > < AvaII
                > < AsuI
                >< AflIII ><
TGTGCAACAG TACATACGGC TAATAAATGG GACCTTATTA TTAGCGATAT GTATGACCCT AGGACCAAAC
    20940        20950        20960        20970        20980        20990        21000

    >< NspI
    >< NspHI
    >< NlaIII >< P1eI
    >< MaeIII        >< HinfI
    ATGTGACAAA AGAGAATGAC TCTAAAGAAG GGTTTTTCAC TTATCTGTGT GGATTTATAA AGCAAAAAC
    21010        21020        21030        21040        21050        21060        21070

    >< ScrFI
    >< MvaI
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    >< DsaV
    >< BstOI
    >< BstNI
    >< BsiLI
    >< BsaJI
    >< BsaJI    >< SfcI
    >< ApyI        > < AluI
    AGCCCTGGGT GGTCTATAG CTGTAAAGAT AACAGAGCAT TCTTGAATG CTGACCTTTA CAAGCTTATG
    21080        21090        21100        21110        21120        21130        21140

                >< Zsp2I
                >< Ppu10I
                >< NsiI
                >< Mph1103I    Tru9I ><
                >< EcoT22I
                >< MseI
    >< BshI        >< NlaIII>< AluI    >< BcgI        >< AvaIII >< SfaNIBcgI/a ><
GGCCATTCT CATGGTGAC AGCTTTTGT ACAAATGTAA ATGCATCATC ATCGGAAGCA TTTTAAATTG
    21150        21160        21170        21180        21190        21200        21210

```

FIGURE 13.49

```

>< Zsp2I
>< SphI
>< Ppu10I
>< PaeI
>< NspI
>< NspHI
>< NsiI
>< NlaIII
> < NlaIII
>< Mph1103I
>< EcoT22I
> < AvaIII >< MnlI
GGGCTAACTA TCTTGGCAAG CCGAAGGAAC AAATTGATGG CTATACCATG CATGCTAACT ACATTTTCTG
21220      21230      21240      21250      21260      21270      21280

>< MboII
>< GsuI
>< BsrI
>< BpmI
>< BbsI
>< NlaIII
GAGGAACACA AATCCTATCC AGTTGTCTTC CTATTCACCTC TTTGACATGA GCAAATTTCC TCTTAAATTA
21290      21300      21310      21320      21330      21340      21350

>< Tru9I
>< MseI
>< Esp4I> < TfiI
>< BsmAI
>< Alw26I
>< AflIII> < HinfI
AGAGGAACTG CTGTAATGTC TCTTAAGGAG AATCAAATCA ATGATATGAT TTATTCTCTT CTGGAAAAAG
21360      21370      21380      21390      21400      21410      21420

>< Tru9I
>< MseI
>< HindII
>< HincII
>< HpaI AflIII >
GTAGGCTTAT CATTAGAGAA AACAACAGAG TTGTGGTTTC AAGTGATATT CTTGTTAACA ACTAAACGAA
21430      21440      21450      21460      21470      21480      21490

>< VneI
>< SnoI
>< SduI
>< NspII
>< HpaII
>< HgiAI
>< HapII
>< Cfr10I
>< Bsp1286I
>< MspI>< BmyI
>< ApaLI
>< Alw44I
>< AgeI >< Alw21I
CATGTTTATT TTCTTATTAT TTCTTACTCT CACTAGTGGT AGTGACCTTG ACCGGTGCAC CACTTTTGAT
21500      21510      21520      21530      21540      21550      21560

> < AluI
>< MnlI
GATGTTCAAG CTCCTAATTA CACTCAACAT ACTTCATCTA TGAGGGGGGT TTACTATCCT GATGAAATTT
21570      21580      21590      21600      21610      21620      21630

>< Sau3AI

```

FIGURE 13. 50

```

>< NdeII
>< MboI
>< DpnII
  >< DpnI
>< BspAI
  >< Bsp143I
    >< Tru9I
    >< MseI > < MboII
    >< DdeI
    >< MaeIII
TTAGATCAGA CACTCTTTAT TTAATCAGG ATTTATTTCT TCCATTTTAT TCTAATGTTA CAGGGTTTCA
  21640      21650      21660      21670      21680      21690      21700

  >< VspI
  >< Tru9I
  >< MseI
  >< AsnI
  >< AseI >< MaeII
    >< Tru9I
    >< MseI >< BbvI
    >< FokI
    > < Fnu4HI
TACTATTAAT CATACGTTTG GCAACCCTGT CATACCTTTT AAGGATGGTA TTTATTTTGC TGCCACAGAG
  21710      21720      21730      21740      21750      21760      21770

    >< BslI
    >< DsaI>< BsiYI
    >< BsaJI
    >< NlaIII
    > < MaeIII
AAATCAAATG TTGTCCTGG TTGGGTTTTT GGTCTACCA TGAACAACAA GTCACAGTCG GTGATTATTA
  21780      21790      21800      21810      21820      21830      21840

    >< NspI
    >< NspHI
    >< MseI
    >< NlaIII
    >< HphI
    >< MaeIII
    >< MaeIII
TTACAATTC TACTAATGTT GTTATACGAG CATGTAACCT TGAATTGTGT GACAACCCTT TCTTTGCTGT
  21850      21860      21870      21880      21890      21900      21910

  >< StyI
  >< NlaIII
  >< NcoI >< RsaI
  >< EcoT14I
  >< Eco130I
  >< DsaI>< Csp6I
  >< BssT1I
  >< BsaJI>< AfaI
    >< Zsp2I
    >< Tru9I
    >< Ppu10I TthHB8I ><
    >< NsiI
    >< MseI
    >< Mph1103I
    >< TthHB8I >< EcoT22I
    >< TaqI >< AvaIII
    >< SfaNI ><
    >< RsaI ><
    >< Csp6I ><
    >< AfaI ><
TTCTAAACCC ATGGGTACAC AGACACATAC TATGATATTC GATAATGCAT TTAATTGCAC TTTCGAGTAC
  21920      21930      21940      21950      21960      21970      21980

    >< Tru9I
    >< MseI
    >< DraI
ATATCTGATG CCTTTTCGCT TGATGTTTCA GAAAAGTCAG GTAATTTTAA ACACTTACGA GAGTTTGTGT
  21990      22000      22010      22020      22030      22040      22050

    >< Sau3AI
    >< NdeII
    >< MboI
    >< DpnII
    >< DpnI
    >< BspAI
>< Tru9I
>< MseI
>< DraI
  >< SfcI
  Bsp143I ><
TTAAAAATAA AGATGGGTTT CTCTATGTTT ATAAGGGCTA TCAACCTATA GATGTAGTTC GTGATCTACC
  22060      22070      22080      22090      22100      22110      22120

    >< Tru9I
    >< MseI
    >< MseI
    >< MnlI
TTCTGGTTTT AACACTTTGA AACCTATTTT TAAGTTGCCT CTTGGTATTA ACATTACAAA TTTTAGAGCC
  22130      22140      22150      22160      22170      22180      22190

```

FIGURE 13. 51

65/116

```

> < SduI>< SfcI
    >< PvuII
    >< Psp5I
> < NspII
    >< NspBII
> < MaeII > < Fnu4HI
> < Bsp1286I >< PstI      Tru9I >
    > < BmyI>< Fnu4HI      MseI >
    >< BspMI
    >< BbvI
    >< AluI
    >< BbvI
ATTCTTACAG CCTTTTCACC TGCTCAAGAC ATTTGGGGCA CGTCAGCTGC AGCCTATTTT GTTGGCTATT
22200      22210      22220      22230      22240      22250      22260

    >< SfaNI
    >< RsaI
> < Csp6I
    >< AfaI      >< AlwNI
TAAAGCCAAC TACATTTATG CTCAAGTATG ATGAAAATGG TACAATCACA GATGCTGTTG ATTGTTCTCA
22270      22280      22290      22300      22310      22320      22330

    > < Tru9I
    > < MseI
    >< AluI
AAATCCACTT GCTGAACTCA AATGCTCTGT TAAGAGCTTT GAGATTGACA AAGGAATTTA CCAGACCTCT
22340      22350      22360      22370      22380      22390      22400

    >< SauI
    >< MstII
    >< Eco81I
    >< DdeI
    >< CvnI
    >< Bsu36I
    >< Bse21I
    >< AxyI      >< TfiI
    >< MnlI      >< AocI      >< MnlI      >< HinfI      >< SspI      >< MnlI
AATTCAGGG TTGTTCCCTC AGGAGATGTT GTGAGATTCC CTAATATTAC AAACCTGTGT CTTTGGGAG
22410      22420      22430      22440      22450      22460      22470

    >< Zsp2I
    >< Ppu10I
    >< NsiI
    > < NlaIII
    >< Mph1103I
    >< EcoT22I
    >< AvaIII
AGGTTTTTAA TGCTACTAAA TTCCCTTCTG TCTATGCATG GGAGAGAAAA AAAATTCTTA ATTGTGTTGC
22480      22490      22500      22510      22520      22530      22540

    >< SduI
    >< NspII
    >< HgiAI
    >< Bsp1286I
    >< BmyI      >< Tru9I
    >< Alw21I      >< MseI      DdeI ><
TGATTACTCT GTGCTCTACA ACTCAACATT TTTTCAACC TTTAAGTGCT ATGGCGTTTC TGCCACTAAG
22550      22560      22570      22580      22590      22600      22610

    >< Sau3AI
    >< NdeII
    >< MboI
    >< DpnII
    >< DpnI

```

FIGURE 13.52

```

    >< BspAI
    >< Bsp143I
TTGAATGATC TTTGCTTCTC CAATGTCTAT GCAGATTCTT TTGTAGTCAA GGGAGATGAT GTAAGACAAA
22620      22630      22640      22650      22660      22670      22680

    >< ScrFI
    >< MvaI
>< HinPII
>< Hin6I
    >< HhaI
    >< HaeII
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    >< DsaV
    >< CfoI
    >< BstOI
    >< BstNI
    >< Bsp143II
    >< BsiLI
    >< ApyI      > < BsrI
TAGCGCCAGG ACAAAGTGGT GTTATTGCTG ATTATAATTA TAAATTGCCA GATGATTTC TGGGTTGTGT
22690      22700      22710      22720      22730      22740      22750

    >< SfaNI
    >< RmaI
    >< MaeI
CCTTGCTTGG AATACTAGGA ACATTGATGC TACTTCAACT GGTAATTATA ATTATAAATA TAGGTATCTT
22760      22770      22780      22790      22800      22810      22820

    >< Sau96I
    >< Pali
    >< NspIV
> < HindIII
    >< HaeIII
    >< EcoO109I
    >< DraII
    >< DdeI
    >< Cfr13I
    >< BsuRI
    >< BsiZI
    >< BshI
    >< BfrI >< PssI
    >< NlaIII >< AsuI>< BsmAI
    >< AluI >< Alw26I
AGACATGGCA AGCTTAGGCC CTTTGAGAGA GACATATCTA ATGTGCCTTT CTCCCCTGAT GGCAAACCTT
22830      22840      22850      22860      22870      22880      22890

    >< Tru9I
    >< Pali
    >< MscI
    >< HaeIII
    >< EaeI>< MseI
    >< Tru9I >< BsuRI
    >< MseI >< BshI
    >< BspMI >< BalI
GCACCCACCC TGCTCTTAAT TGTTATTGGC CATTAAATGA TTATGGTTTT TACACCACTA CTGGCATTGG
22900      22910      22920      22930      22940      22950      22960

    >< Sau96I ><
    >< PalINspIV ><
> < MspI NspHII ><
    >< HaeIII

```

FIGURE 13.53



67/116

```

                                > < HpaII Eco47I ><
                                >< DsaI
                                > < HapII Cfr13I ><
                                >< BsuRISinI ><
                                >< GdiII BsiZI ><
                                >< BsaJI
                                >< ScaI
                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< AfaI
CTACCAACCT TACAGAGTTG TAGTACTTTC TTTTGAACCT TTAAATGCAC CGGCCACGGT TTGTGGACCA
  22970      22980      22990      23000      23010      23020      23030

                                >< Tru9I
                                >< Tru9I
                                >< PleI
                                >< MseI
                                >< RsaI
                                >< Csp6I
                                >< BsrI ><
                                >< BsrI
                                >< MseI >< BsrI
                                >< MseI >< HinfI
                                >< AfaI
AAATTATCCA CTGACCTTAT TAAGAACCAG TGTGTCAATT TTAATTTTAA TGGACTCACT GGTACTGGTG
  23040      23050      23060      23070      23080      23090      23100

                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< MboII
                                >< HpaI
                                >< HindII
                                >< HincII
                                >< Pali
                                >< HaeIII
                                >< GdiII
                                >< EaeI
                                >< BsuRI
                                >< BshI
                                TfiI ><
                                HinfI ><
TGTTAACTCC TTCTTCAAAG AGATTTC AAC CATTTC AACA ATTTGGCCGT GATGTTTCTG ATTTCACTGA
  23110      23120      23130      23140      23150      23160      23170

                                > < XhoII
                                >< TthHB8I
                                >< TaqI
                                > < Sau3AI
                                > < NdeII
                                > < MflI
                                > < MboI
                                > < DpnII
                                >< DpnI
                                > < BstYI
                                > < BspAI
                                > < SspI
                                >< AlwI >< Bsp143I
                                >< HphI
TTCCGTTTCGA GATCCTAAAA CATCTGAAAT ATTAGACATT TCACCTTGCT CTTTTGGGGG TGTAAGTGTA
  23180      23190      23200      23210      23220      23230      23240

                                >< ScrFI
                                >< MvaI
                                >< EcoRII
                                >< Ecl136I
                                >< DsaV
                                >< BstOI
                                >< BstNI
                                >< BsiLI
                                >< ApyI
                                >< Tru9I
                                >< MseI
                                >< HpaI
                                >< HindII
                                >< Eco57I
                                >< BsgI
                                >< HincII
ATTACACCTG GAACAAATGC TTCATCTGAA GTTGCTGTTC TATATCAAGA TGTAACTGC ACTGATGTTT
  23250      23260      23270      23280      23290      23300      23310

                                >< Sau3AI
                                >< NlaIII
                                >< NdeII
                                >< MboI
                                >< DpnII
                                >< DpnI
                                >< HinfI

```

FIGURE 13. 54

```

    >< BspWI
    >< BspAI
    >< SfcI
    CTACAGCAAT TCATGCAGAT CAACTCACAC CAGCTTGGCG CATATATTCT ACTGGAAACA ATGTATTCCA
    23320      23330      23340      23350      23360      23370      23380

    >< Hin6I
    > < HhaI
    >< Bsp143I
    >< AluI> < CfoI
    >< BsrI
    >< TthHB8I
    >< TaqI
    >< SalI
    >< RtrI
    >< NspI
    >< EspI >< NspHI
    >< DdeI >< NlaIII
    >< CelII >< HindII
    >< Bpu1102I>< HincII
    >< HinfI
    GACTCAAGCA GGCTGTCTTA TAGGAGCTGA GCATGTCGAC ACTTCTTATG AGTGCGACAT TCCTATTGGA
    23390      23400      23410      23420      23430      23440      23450

    > < SnaBI
    >< ScaI
    >< RsaI
    >< RmaI
    >< MaeII >< MaeI
    > < Eco105I
    >< Csp6I
    >< BsaAI
    >< AfaI
    >< RmaI
    >< MaeIII
    >< AluI >< MaeI
    GCTGGCATTG GTGCTAGTTA CCATACAGTT TCTTTATTAC GTAGTACTAG CCAAAAATCT ATTGTGGCTT
    23460      23470      23480      23490      23500      23510      23520

    >< MunI
    ATACTATGTC TTTAGGTGCT GATAGTTCAA TTGCTTACTC TAATAACACC ATTGCTATAC CTAATAACTT
    23530      23540      23550      23560      23570      23580      23590

    RsaI ><
    >< MnlI
    Csp6I ><
    AfaI ><
    >< SfcI
    TTCAATTAGC ATTACTACAG AAGTAATGCC TGTTCCTATG GCTAAAACCT CCGTAGATTG TAATATGTAC
    23600      23610      23620      23630      23640      23650      23660

    > < TfiI
    > < HinfI
    >< AciI
    ATCTGCGGAG ATTCTACTGA ATGTGCTAAT TTGCTTCTCC AATATGGTAG CTTTTCGACA CAACTAAATC
    23670      23680      23690      23700      23710      23720      23730

    >< VneI
    >< SduI
    >< NspII
    >< HgiAI
    >< SnoI>< DdeI
    >< Bsp1286I
    >< BmyI
    >< BbvI
    >< ApaLI
    >< Alw44I
    >< Alw21I
    >< Fnu4HI
    GTGCACTCTC AGGTATTGCT GCTGAACAGG ATCGCAACAC ACGTGAAGTG TTCGCTCAAG TCAAACAAAT
    23740      23750      23760      23770      23780      23790      23800

    >< PmlI
    >< PmaCI
    >< MaeII
    >< Eco72I
    >< BsaAI
    >< BbrPI
    >< DpnII >< AlwI
    >< BspAI >< AflIII

```

FIGURE 13.55

```

>< RsaI
>< Csp6I
>< AfaI
GTACAAAACC CCAACTTTGA AATATTTTGG TGGTTTAAAT TTTTCACAAA TATTACCTGA CCCTCTAAAG
23810      23820      23830      23840      23850      23860      23870

>< MnlI
>< MnlI
>< DdeI >< MnlI
CCAATAAGA GGTCTTTTAT TGAGGACTTG CTCTTTAATA AGGTGACACT CGCTGATGCT GGCTTCATGA
23880      23890      23900      23910      23920      23930      23940

>< XhoII
>< Sau3AI
>< StyI
>< RmaI
>< MaeI
>< EcoT14I
>< Eco130I
>< BssT1I
>< BsmI
>< BscCI
>< BsaJI
>< BlnI
>< AvrII
>< RmaI
>< NdeII
>< MflI
>< MboI
>< MaeI
>< DpnII
>< HphI> < DpnI
>< BstYI
>< BspAI
> < Bsp143I
>< BglII
>< MstI
>< HinPII
>< Hin6I
>< HhaI
>< FspI
>< FdiII
>< CfoI
>< AviII
AGCAATATGG CGAATGCCTA GGTGATATTA ATGCTAGAGA TCTCATTTGT GCGCAGAAGT TCAATGGACT
23950      23960      23970      23980      23990      24000      24010

>< RmaIRsaI ><
>< MnlI
>< Fnu4HI
>< Fnu4HI Csp6I ><
>< BspWI >< BbvI
>< BbvI >< BspWI >< MaeIAfaI ><
TACAGTGTG CCACCTCTGC TCACTGATGA TATGATTGCT GCCTACACTG CTGCTCTAGT TAGTGGTACT
24020      24030      24040      24050      24060      24070      24080

>< MboII
>< HinPII
>< Hin6I
>< HhaI
>< HaeII
>< Fnu4HI >< Ksp632I
>< CfoI >< EarI
>< FokI >< BspWI >< Eam1104I
>< BbvI
>< Bsp143II
GCCACTGCTG GATGGACATT TGGTGCTGGC GCTGCTCTTC AAATACCTTT TGCTATGCAA ATGGCATATA
24090      24100      24110      24120      24130      24140      24150

Tru9I ><
MseI ><
GGTTCAATGG CATTGGAGTT ACCCAAAATG TTCTCTATGA GAACCAAAAA CAAATCGCCA ACCAATTTAA
24160      24170      24180      24190      24200      24210      24220

MaeII ><
>< Fnu4HI
>< AluI
CAAGGCGATT AGTCAAATTC AAGAATCACT TACAACAACA TCAACTGCAT TGGGCAAGCT GCAAGACGTT
24230      24240      24250      24260      24270      24280      24290

>< Tru9I
>< MseI
>< HpaI
>< HindII
>< HincII>< BscCI
>< BsmI >< Tru9I
>< Tru9I >< BfrI
>< MseI >< AluI
>< DdeI
>< BfrI

```

FIGURE 13. 56

```

GTTAACCAGA ATGCTCAAGC ATTAAACACA CTTGTTAAAC AACTTAGCTC TAATTTTGGT GCAATTTCAA
 24300      24310      24320      24330      24340      24350      24360

      >< ThaI
      >< SpoI
      >< NruI
      >< MvnI
      >< BstUI      >< TthHB8I
      >< Bsp68I      >< TaqI      >< RsaI
    >< EcoRV    >< Bsp50I      >< MnlI      >< Csp6I      >< Tru9I
    >< Eco32I    >< AccII    >< MnlI      >< AciI>< AfaI      >< MseI
GTGTGCTAAA TGATATCCTT TCGCGACTTG ATAAAGTCGA GCGCGAGGTA CAAATTGACA GGTTAATTAC
 24370      24380      24390      24400      24410      24420      24430

      >< MaeIII    >< BbvI      >< Fnu4HI      BbvI ><
AGGCAGACTT CAAAGCCTTC AAACCTATGT AACACAACAA CTAATCAGGG CTGCTGAAAT CAGGGCTTCT
 24440      24450      24460      24470      24480      24490      24500

      >< Fnu4HI
    >< BspWI      >< DdeI      >< HindII
    >< BspWI      >< DdeI      >< HincII
GCTAATCTTG CTGCTACTAA AATGTCTGAG TGTGTTCTTG GACAATCAAA AAGAGTTGAC TTTTGTGGAA
 24510      24520      24530      24540      24550      24560      24570

      > < NspI
      > < NspHI
      > < NlaIII
    >< MaeIII
      >< MaeII
      >< NlaIII
      >< MboII
      >< FokI
    >< Fnu4HI    >< BbsI      BsaAI ><
      >< AciI>< BbvI      >< AflIII
AGGGCTACCA CCTTATGTCC TTCCCACAAG CAGCCCCGCA TGGTGTGTC TTCCTACATG TCACGTATGT
 24580      24590      24600      24610      24620      24630      24640

      >< ScrFI
      >< MvaI
    >< EcoRII
      >< Ecl136I
      >< BstOI
      >< BstNI
    >< MnlI >< BslI      >< HinPII
    >< DsaV>< BsiYI      >< Hin6I
      >< BsiLI      >< HhaI
      >< BsaJI>< HphI      >< HaeII
      >< ApyI      >< CfoI      >< NlaIII
      >< Bsp143II >< BspHI      EcoNI ><
GCCATCCCAG GAGAGGAACT TCACCACAGC GCCAGCAATT TGTCATGAAG GCAAAGCATA CTTCCCTCGT
 24650      24660      24670      24680      24690      24700      24710

      >< MnlI
    >< BslI      >< Tru9I
    >< BsiYI      >< MseI      >< MnlI
GAAGGTGTTT TTGTGTTTAA TGGCACTTCT TGGTTTATTA CACAGAGGAA CTTCTTTTCT CCACAAATAA
 24720      24730      24740      24750      24760      24770      24780

      >< DdeI      >< Tru9I
      >< BsmAI      >< SfaNI
    >< SfcI      >< Alw26I      >< MseIAlwI ><
TTACTACAGA CAATACATTT GTCTCAGGAA ATTGTGATGT CGTTATTGGC ATCATTAACA ACACAGTTTA
 24790      24800      24810      24820      24830      24840      24850

    >< Sau3AI
    >< NdeII

```

FIGURE 13.57

71/116

```

>< MboI          >< P1eI          > < ScaI
>< DpnII         >< MnlI          > < Ksp632I      > < RsaI
  >< DpnI         >< DdeI  >< HinfI      >< MboII
>< BspAI         >< BspWI         > < Eam1104I      >< Csp6I
  >< Bsp143I      >< AluI          > < EarI   > < AluI   > < AfaI   > < HphI
TGATCCTCTG CAACCTGAGC TTGACTCATT CAAAGAAGAG CTGGACAAGT ACTTCAAAAA TCATACATCA
  24860      24870      24880      24890      24900      24910      24920

  >< Sau3AI
  >< NdeII
  >< MboI
>< MamI
  >< DpnII
    >< DpnI
  >< BspAI
    >< Bsp143I
  >< BsiBI          >< Tru9I          >< HindII
  >< BsaBI          >< MseI          >< HincII          AciI ><
CCAGATGTTG ATCTTGCGCA CATTTCAGGC ATTAACGCTT CTGTCGTCAA CATTCAAAAA GAAATTGACC
  24930      24940      24950      24960      24970      24980      24990

          >< Tru9I
          > < TfiI
          >< MnlI          >< SwaI
  >< EcoNI          >< MseI
    >< BslI          > < HinfI
>< MnlI>< BsiYI      >< DraI
GCCTCAATGA GGTCGCTAAA AATT'TAAATG AATCACTCAT TGACCTTCAA GAATTGGGAA AATATGAGCA
  25000      25010      25020      25030      25040      25050      25060

  >< StyI
  >< P1eI
  >< HaeIII
  >< EcoT14I
  >< Eco130I
  >< BsuRI
  >< BssT1I
  >< Tru9I>< BshI          NlaIII ><
  >< MseI  >< BsaJI          MaeIII ><
          >< BstXI
ATATATTAAA TGGCCTTGGT ATGTTTGGCT CGGCTTCATT GCTGGACTAA TTGCCATCGT CATGGTTACA
  25070      25080      25090      25100      25110      25120      25130

          > < SphI
          > < PaeI
          > < NspI
          > < NspHI
          > < NlaIII
          > < MaeI
          >< MnlI>< BbvI Fnu4HI ><
ATCTTGCTTT GTTGCATGAC TAGTTGTTGC AGTTGCCTCA AGGGTGCATG CTCTTGTGGT TCTTGCTGCA
  25140      25150      25160      25170      25180      25190      25200

          >< FokI
          >< DdeI
>< MnlI >< P1eI>< HinfI >< BsrI
AGTTTGATGA GGATGACTCT GAGCCAGTTC TCAAGGGTGT CAAATTACAT TACACATAAA CGAAGTTATG
  25210      25220      25230      25240      25250      25260      25270

          >< Sau3AI
          >< NdeII
          >< MboI
          >< DpnII
          > < DpnI

```

FIGURE 13.58

72/116

```

      >< BspAI
        > < Bsp143I
          >< BsgI          >< AlwI          >< BsrI          BspWI >
GATTTGTTTA TGAGATTTTT TACTCTTGGA TCAATTACTG CACAGCCAGT AAAAATTGAC AATGCTTCTC
25280      25290      25300      25310      25320      25330      25340

      >< ScaI
      >< RsaI
      >< Csp6I          >< SfcI
      >< AfaI          >< NlaIII          >< AciI          >< MnlI          FokI >
CTGCAAGTAC TGTTTCATGCT ACAGCAACGA TACCGCTACA AGCCTCACTC CCTTTCGGAT GGCTTGTTAT
25350      25360      25370      25380      25390      25400      25410

      > < HinPI
      > < Hin6I
      >< HhaI
      >< HaeII          >< HinPI          RmaI ><
      >< Eco47III          >< Hin6I          NheI ><
      >< CfoI          >< HhaI          Fnu4HI ><
      >< BspWI          >< Bsp143II          >< CfoI          AluI ><
TGGCGTTGCA TTTCTTGCTG TTTTTCAGAG CGCTACCAAA ATAATTGCGC TCAATAAAAG ATGGCAGCTA
25420      25430      25440      25450      25460      25470      25480

      >< EcoNI
      >< BslI
      >< BsiYI
      >< BbvI          >< BsrI          >< BbvI          > < Fnu4HI          BbvI ><
GCCCTTTATA AGGGCTTCCA GTTCATTTGC AATTTACTGC TGCTATTTGT TACCATCTAT TCACATCTTT
25490      25500      25510      25520      25530      25540      25550

      >< BspMI          >< MnlI          >< CfoI          >< AfaI          >< MnlI          AvaIII ><
TGCTTGTCGC TGCAGGTATG GAGGCGCAAT TTTTGTACCT CTATGCCTTG ATATATTTTC TACAATGCAT
25560      25570      25580      25590      25600      25610      25620

      >< SfaNI
      >< NspI
      >< NspHI
      >< NlaIII          >< SfaNI
CAACGCATGT AGAATTATTA TGAGATGTTG GCTTTGTTGG AAGTGCAAAT CCAAGAACCC ATTACTTTAT
25630      25640      25650      25660      25670      25680      25690

      >< Bst1107I
      >< AccI          MaeIII ><
GATGCCAACT ACTTTGTTTG CTGGCACACA CATAACTATG ACTACTGTAT ACCATATAAC AGTGTCACAG
25700      25710      25720      25730      25740      25750      25760

      >< MboII
      BstXI ><
      >< MunI >< MaeIII >< MaeIII          >< Eco57I          >< BbsI MnlI >
ATACAATTGT CGTTACTGAA GGTGACGGCA TTTCAACACC AAAACTCAAA GAAGACTACC AAATTGGTGG
25770      25780      25790      25800      25810      25820      25830

      >< RsaI
      > < NlaIII
      >< HphI
      >< Tru9I >< Tth111I >< Csp6I
      >< DdeI          >< DdeI          >< MseI >< AspI          >< AfaI

```

FIGURE 13.59

```

TTATTCTGAG GATAGGCACT CAGGTGTTAA AGACTATGTC GTTGATCATG GCTATTTTCAC CGAAGTTTAC
25840      25850      25860      25870      25880      25890      25900

      > < HinfI>< P1eI      >< BsrI      Tru9I ><
      >< AluI >< AccI      >< SfcI >< AlwNI      >< MboII      MseI ><
TACCAGCTTG AGTCTACACA AATTACTACA GACACTGGTA TTGAAAATGC TACATTCTTC ATCTTTAACA
25910      25920      25930      25940      25950      25960      25970

      > < TthHB8I
      >< Tru9I      > < TaqI      >< Ksp632I
      >< MseI      > < MboII      >< EarI BspWI ><
>< AluI      >< Eco57I      >< Eam1104I AlwI ><
AGCTTGTTAA AGACCCACCG AATGTGCAAA TACACACAAT CGACGGCTCT TCAGGAGTTG CTAATCCAGC
25980      25990      26000      26010      26020      26030      26040

>< XhoII
>< Sau3AI
>< NlaIV
>< NdeII
>< MflI
>< MboI
>< DpnII
>< DpnI
>< BstYI
>< BstI
>< BspAI
>< Bsp143I
>< BscBI
>< BamHI >< AlwI
AATGGATCCA ATTTATGATG AGCCGACGAC GACTACTAGC GTGCCTTTGT AAGCACAAGA AAGTGAGTAC
26050      26060      26070      26080      26090      26100      26110

      > < Tru9I
      >< RsaI
      > < MseI
      >< MboII
      >< MaeII
      > < RsaI
      >< Csp6I
      > < AfaI
      >< Csp6I
      >< AfaI
      >< Tru9I >< Csp6I
      >< AfaI
      >< MseI
      >< AfaI
GAACTTATGT ACTCATTCGT TTCGGAAGAA ACAGGTACGT TAATAGTTAA TAGCGTACTT CTTTTTCTTG
26120      26130      26140      26150      26160      26170      26180

      >< TthHB8I
      >< TaqI
      >< RmaI
      > < MaeIII
      >< MaeI >< RmaI
      >< FokI >< MaeI
      >< RmaI
      >< HinPII
      >< Hin6I
      > < RsaI
      >< HhaI
      >< CfoI >< BbvI > < AfaI
      >< Fnu4HI ><
      >< Csp6I
      >< AfaI
CTTTCGTGGT ATTCTTGCTA GTCACACTAG CCATCCTTAC TGCCTTTCGA TTGTGTGCGT ACTGCTGCAA
26190      26200      26210      26220      26230      26240      26250

      >< Tru9I
      >< ThaI
      >< MseI
      >< MvnI
      >< MseI
      >< HpaI
      >< BstUI
      >< Ksp632I >
      >< HindII
      >< MaeII >< Bsp50I >< MboII EarI >
      >< HincII
      >< AccI >< AccII
      >< Eam1104I >
TATTGTTAAC GTGAGTTTAG TAAAACCAAC GGTTTACGTC TACTCGCGTG TTAAAAATCT GAACTCTTCT
26260      26270      26280      26290      26300      26310      26320

```

FIGURE 13.60

74/116

```

    >< Sau3AI
    >< NdeII
    >< MboI
    >< DpnII
    >< MboII>< DpnI
    >< XmnI >< BspAI> < Eco57I
    >< Asp700I>< Bsp143I
    GAAGGAGTTC CTGATCTTCT GGTCTAAACG AACTAACTAT TATTATTATT CTGTTTGGAA CTTTAACATT
    26330      26340      26350      26360      26370      26380      26390

    >< ScrFI
    >< MvaI
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    >< DsaV NlaIV ><
    >< BstOI
    >< BstNI RmaI ><
    >< BsiLI MaeI ><
    >< ApyIBscBI ><
    >< RsaI
    >< MnlI
    >< Tru9I
    >< Csp6I
    >< MseI
    >< BstNI
    >< AfaI
    >< AluI
    >< ApyI
    >< MaeIII
    GCTTATCATG GCAGACAACG GTACTATTAC CGTTGAGGAG CTAAACAAC TCCTGGAACA ATGGAACCTA
    26400      26410      26420      26430      26440      26450      26460

    >< ScrFI
    >< RmaI
    >< MvaI
    >< MaeI
    >< EcoRII
    >< Ecl136I
    >< DsaV
    >< BstOI
    >< BstNI
    >< BsiLI
    >< ApyI
    >< MaeIII
    GTAATAGGTT TCCTATTCCT AGCCTGGATT ATGTTACTAC AATTTGCCTA TTCTAATCGG AACAGGTTTT
    26470      26480      26490      26500      26510      26520      26530

    >< Pali
    >< MscI
    >< MnlI >< MaeIII
    >< HaeIII
    >< EaeI
    >< BsuRI
    >< BsrI
    >< RsaI
    >< BspWI
    >< Csp6I >< HindIII
    >< BshI
    >< AfaI >< AluI
    >< BalI
    >< BbvI Fnu4HI ><
    TGTACATAAT AAAGCTTGTT TTCCTCTGGC TCTTGTGGCC AGTAACACTT GCTTGTTTTG TGCTTGCTGC
    26540      26550      26560      26570      26580      26590      26600

    >< VspI
    >< Tru9I
    >< MseI
    >< HphI
    >< SfcI >< AsnI
    >< BsrI
    >< AccI >< AseI>< MaeIII>< AciI
    TGTCTACAGA ATTAATTGGG TGACTGGCGG GATTGCGATT GCAATGGCTT GTATTGTAGG CTTGATGTGG
    26610      26620      26630      26640      26650      26660      26670

    >< EspI
    >< Eco57I
    >< DdeI
    >< CelII
    >< Bpu1102I
    >< RsaI
    >< Csp6I

```

FIGURE 13.61



```

>< BfrI                                     >< AfaI
  >< AluI                                     >< AciI                                     MboII >
CTTAGCTACT TCGTTGCTTC CTTCAGGCTG TTTGCTCGTA CCCGCTCAAT GTGGTCATTC AACCCAGAAA
  26680      26690      26700      26710      26720      26730      26740

      >< ScrFI
      >< NciI
      >< MspI
      >< HpaII
      >< HapII
      >< DsaV>< MnlI
      >< BslI
      >< BsiYI
      >< BsaJI >< MunI          > < XcmI
      >< BcnI          >< MaeIII >< AciI >< NlaIII
CAAACATTCT TCTCAATGTG CCTCTCCGGG GGACAATTGT GACCAGACCG CTCATGGAAA GTGAACCTGT
  26750      26760      26770      26780      26790      26800      26810

Tru9I ><
  SinI >
  Sau96I >
  PpuMI >
  NspIV >
  MseI ><
      >< MaeIII
      >< Sau3AI
      >< NdeII
      >< MboI
      >< FbaI
      >< DpnII
      >< DpnI
      >< BspAI
      >< Bsp143I
      >< BsiQI
      >< BclI
      >< MaeIII
      >< Pali
      >< MspI
      >< HpaII
      >< HapII
      >< HaeIII
      >< GdiII
      >< EaeI
      >< BsuRI
      >< BshI
      > < RmaI >< HaeII
      > < MaeI Eco0109I >
      >< HinPIIEco47I >
      >< StyI>< Hin6I DraII >
      >< EcoT14I Cfr13I >
      >< Eco130I>< Bsp143II
      >< BssT1I BsiZI >
      >< BsaJI Bme18I >
      >< BlnI >< HhaI AvaII >
      >< AvrII >< CfoI AsuI >
CATTGGTGCT GTGATCATTC GTGGTCACTT GCGAATGGCC GGACACTCCC TAGGGCGCTG TGACATTAAG
  26820      26830      26840      26850      26860      26870      26880

      >< Sau3AI
      >< NdeII
      >< MboI
      >< DpnII
      >< DpnI
      >< PssI >< BspMI
      >< Psp5II >< BspAI
      >< NspHII >< Bsp143I
      >< XmnI
      >< Asp700I > < HgaI Fnu4HI ><
GACCTGCCAA AAGAGATCAC TGTGGCTACA TCACGAACGC TTTCTTATTA CAAATTAGGA GCGTCGCAGC
  26890      26900      26910      26920      26930      26940      26950

      >< TfiI
      >< HinfI
      >< BbvI
      >< BbvI
      >< Fnu4HI >< AciI
      >< Tru9I
      >< MseI
GTGTAGGCAC TGATTCAGGT TTTGCTGCAT ACAACCGCTA CCGTATTGGA AACTATAAAT TAAATACAGA
  26960      26970      26980      26990      27000      27010      27020

      >< MspI
      >< HpaII
      >< HapII
      >< Cfr10I
      >< BcgI/a
      >< RsaI
      >< RmaI
      >< Csp6I
      >< MaeI>< BcgI
      >< AfaI >< MaeIII
      HindII ><
      HincII ><
      >< SspI

```

FIGURE 13.62

```

CCACGCCGGT AGCAACGACA ATATTGCTTT GCTAGTACAG TAAGTGACAA CAGATGTTTC ATCTTGTTGA
  27030      27040      27050      27060      27070      27080      27090

>< ScrFI
>< MvaI
  >< MaeIII
>< EcoRII
  >< Ecl136I
>< DsaV
  >< BstOI
  >< BstNI
  >< BsiLI
  >< ApyI
                                >< MnlI
                                HinfI ><
CTTCCAGGTT ACAATAGCAG AGATATTGAT TATCATTATG AGGACTTTCA GGATTGCTAT TTGGAATCTT
  27100      27110      27120      27130      27140      27150      27160

                                >< BsmAI
                                >< Tru9I
                                > < MnlI
>< MaeII
  >< Alw26I
  >< MseI
  >< DdeI
                                >< MboII
GACGTTATAA TAAGTTCAAT AGTGAGACAA TTATTTAAGC CTCTAACTAA GAAGAATTAT TCGGAGTTAG
  27170      27180      27190      27200      27210      27220      27230

                                >< Ksp632I
                                >< MboII
                                >< EarI
ATGATGAAGA ACCTATGGAG TTAGATTATC CATAAACGA ACATGAAAAT TATTCTCTTC CTGACATTGA
  27240      27250      27260      27270      27280      27290      27300

                                > < RsaI >< RsaI
                                >< Csp6I >< Csp6I
                                > < AluI
                                >< MnlI
                                > < AfaI >< AfaI
TTGTATTTAC ATCTTGCGAG CTATATCACT ATCAGGAGTG TGTTAGAGGT ACGACTGTAC TACTAAAAGA
  27310      27320      27330      27340      27350      27360      27370

                                >< MnlI
                                >< HphI
                                >< HphI
                                >< MnlI
ACCTTGCCCA TCAGGAACAT ACGAGGGCAA TTCACCATTT CACCCTCTTG CTGACAATAA ATTTGCACTA
  27380      27390      27400      27410      27420      27430      27440

                                Sau3AI >
                                > < PvuII
                                > < Psp5I
                                > < NspBII
                                >< TthHB8I
                                NdeII >
                                >< TaqI
                                MboI >
                                >< RsaI
                                >< Fnu4HI
                                >< Csp6I
                                DpnII >
                                >< BbvI
                                BspAI >
                                >< AfaI
                                > < AluI
ACTTGCACTA GCACACACTT TGCTTTTGCT TGTGCTGACG GTACTCGACA TACCTATCAG CTGCGTGCAA
  27450      27460      27470      27480      27490      27500      27510

                                >< SstI
                                >< SduI
                                >< SacI
                                >< NspII
                                >< HgiAI
                                >< Eco24I
                                > < Ecl136II
                                >< BspWI
                                >< Bsp1286I
                                >< BmyI
                                >< BanII
                                >< Alw21I

>< HphI
>< DpnI
                                >< MnlI

```

FIGURE 13. 63

```

>< Bsp143I          >< MnlI          > < AluI      BbvI ><
GATCAGTTTC ACCAAAAC TTTCATCAGAC AAGAGGAGGT TCAACAAGAG CTCTACTCGC CACTTTTTCT
27520      27530      27540      27550      27560      27570      27580

                                     SstI ><
                                     SduI ><
                                     SacI ><
                                     NspII ><
                                     HgiAI ><
                                     Eco24I ><
                                     Ecl136II ><
                                     Bsp1286I ><
                                     BmyI ><
                                     BanII ><
                                     Alw21I ><
                                     AluI ><
>< Fnu4HI          >< MaeI          >< MseI          >< Tru9I          >< Tru9I
CATTGTTGCT GCTCTAGTAT TTTTAATACT TTGCTTCACC ATTAAGAGAA AGACAGAATG AATGAGCTCA
27590      27600      27610      27620      27630      27640      27650

>< Tru9I          >< Tru9I
>< MseI          >< MseI
CTTTAATTGA CTTCTATTTG TGCTTTTTAG CCTTTCTGCT ATTCCTTGTT TTAATAATGC TTATTATATT
27660      27670      27680      27690      27700      27710      27720

>< XhoII
>< XbaI
> < ScrFI
>< Sau3AI
>< RmaI
>< NdeII
> < MvaI
>< MflI
>< MboI
>< EcoRII>< MaeI
> < Ecl136I
>< DpnII
>< DpnI
>< BstYI
> < BstOI
> < BstNI
>< TthHB8I >< BspAI          > < RsaI
>< DsaV>< Bsp143I          >< MboII
> < BsiLI          >< Csp6I
>< TaqI > < ApyI > < AlwI > < AfaI          >< NlaIIII
TTGGTTTTCA CTCGAAATCC AGGATCTAGA AGAACCTTGT ACCAAAAGTCT AAACGAACAT GAAACTTCTC
27730      27740      27750      27760      27770      27780      27790

                                     >< HinP1I
                                     >< Hin6I
                                     >< HhaI
                                     >< RsaI >< HaeII
                                     >< SfcI          >< Eco47III
                                     >< Csp6I>< CfoI SfaNI ><
                                     >< AfaI >< Bsp143II
>< NdeI
ATTGTTTTGA CTTGTATTTT TCTATGCAGT TGCATATGCA CTGTAGTACA GCGCTGTGCA TCTAATAAAC
27800      27810      27820      27830      27840      27850      27860

>< XhoII
>< Sau3AI
>< NdeII
> < MnlI
>< MflI

```

FIGURE 13.64

78/116

```

    >< MboI
    >< DpnII
        >< DpnI        >< RsaI
        >< BstYI    >< MboII
    >< NlaIII>< BspAI        >< Csp6I >< RmaI
        >< AlwI >< Bsp143I    >< AfaI >< MaeI
CTCATGTGCT TGAAGATCCT TGTAAGGTAC AACACTAGGG GTAATACTTA TAGCACTGCT TGGCTTTGTG
    27870      27880      27890      27900      27910      27920      27930

>< SduI
>< RmaI
>< NspII
>< MaeI
>< HgiAI
>< Bsp1286I
>< BmyI
>< Alw21I
                                >< NspI
                                >< NspHI
                                >< NlaIII    >< MaeIII
CTCTAGGAAA GGTTTTACCT TTTCATAGAT GGCACACTAT GGTTCAAACA TGCACACCTA ATGTTACTAT
    27940      27950      27960      27970      27980      27990      28000

    > < XhoII
    > < Sau3AI > < Van91I
        >< PvuII
        >< Psp5I
    > < NdeII > < PflMI
    > < MflI>< NspBII
    > < DpnII        >< HinPII
        >< Bsp143I    >< Hin6I
    > < BstYI > < BslI >< HhaI >< RmaI
    > < BspAI > < BsiYI>< CfoI >< MaeI
    > < MboI>< AluI>< BspWI >< BspWI
    >< AlwI >< DpnI > < AccB7I    >< AluI
CAACTGTCAA GATCCAGCTG GTGGTGCCTG TATAGCTAGG TGTGGTACC TTCATGAAGG TCACCAAAC
    28010      28020      28030      28040      28050      28060      28070

                                >< SinI
                                >< Sau96I
                                >< NspIV
                                NspHII ><
                                NlaIV ><
                                >< Eco47I
                                >< Cfr13I
                                >< BsiZI
                                BscBI ><
                                >< Bme18I
                                >< AvaII
                                >< AsuI
    >< Fnu4HI    >< RsaI
    >< Esp3I    >< MaeII
    >< BsmAI    >< Csp6I    >< Tru9I
    >< Alw26I    >< BsmBI    >< MseI
    >< AfaI    >< DraI
GCTGCATTTA GAGACGTACT TGTGTTTAA AATAAACGAA CAAATTAAAA TGTCTGATAA TGGACCCCAA
    28080      28090      28100      28110      28120      28130      28140

                                >< SinI
                                >< Sau96I
                                >< NspIV
                                >< NspHII
                                >< NlaIV
                                >< Eco47I
                                >< Cfr13I
                                >< BsiZI
                                >< BscBI
                                >< Bme18I
                                >< AvaII
                                >< AsuI
    >< SduI
    >< NspII
    >< Bsp1286I
    >< BmyI
    >< MaeII    >< AciI
                                >< BscBI
                                >< Bme18I
                                >< AvaII >< TfiI
                                >< AsuI    >< HinfI
                                >< MnlI

```

FIGURE 13. 65

```

TCAAACCAAC GTAGTGCCCC CCGCATTACA TTTGGTGGAC CCACAGATTC AACTGACAAT AACCAGAATG
28150      28160      28170      28180      28190      28200      28210

      >< HinPII >< StyI
      >< HaeII
      > < Pali >< Hin6I >< EcoT14I
      > < HaeIII >< HhaI>< Eco130I
      >< BspWI >< BssTII
      > < BsuRI >< Bsp143II
      >< HgaI> < BshI >< CfoI>< BsaJI >< HgaI
GAGGACGCAA TGGGGCAAGG CCAAAACAGC GCCGACCCCA AGGTTTACCC AATAATACTG CGTCTTGTT
28220      28230      28240      28250      28260      28270      28280

      >< TthHB8I
      > < ScrFI
      >< Pali
      >< PaeR7I
      >< NspIII
      > < MvaI
      >< HaeIII
      >< EcoRII
      >< Eco88I
      >< XhoI > < Ecl136I
      >< DsaV
      >< BsuRI
      >< SlaI > < BstOI
      >< MnlI>< TaqI> < BstNI
      >< CcrI > < BsiLI
      >< HinfI >< BshI
      >< TfiI>< BcoI>< BsaJI
      >< MnlI >< DdeI >< Aval > < ApyI
      >< AluI >< DdeI > < NlaIII >< BfrI >< Ama87I >< MnlI
CACAGCTCTC ACTCAGCATG GCAAGGAGGA ACTTAGATTC CCTCGAGGCC AGGGCGTTCC AATCAACACC
28290      28300      28310      28320      28330      28340      28350

      >< SinI
      >< Sau96I
      >< NspIV
      >< NspHII
      >< Eco47I
      >< Cfr13I
      >< BsiZI
      >< Bme18I > < Ksp632I
      >< AvaII > < Eam1104I
      >< AsuI > < EarI > < AluI>< MboII >< MaeIII
AATAGTGGTC CAGATGACCA AATTGGCTAC TACCGAAGAG CTACCCGACG AGTTCGTGGT GGTGACGGCA
28360      28370      28380      28390      28400      28410      28420

      >< SstI
      >< SduI
      >< SacI
      >< NspII
      >< HgiAI
      >< EspI
      >< Eco24I
      >< Ecl136II >< StyI >< Sau96I
      >< DdeI >< RmaI >< Pali
      >< CelII >< MaeI >< NspIV
      >< Bsp1286I >< EcoT14I >< Cfr13I
      >< Bpu1102I >< Eco130I >< BsuRI
      >< BmyI >< BssTII > < BsrI
      >< BanII >< RsaI >< BsaJI >< BsiZI

```

FIGURE 13. 66

80/116

```

    >< Alw21I    >< Csp6I    >< BlnI    >< BshI>< HindIII
>< HphI  >< AluI    >< AfaI    >< AvrII  >< AsuI    >< AluI
AAATGAAAGA GCTCAGCCCC AGATGGTACT TCTATTACCT AGGAACTGGC CCAGAAGCTT CACTTCCCTA
28430      28440      28450      28460      28470      28480      28490

>< HinPII
>< Hin6I
>< HhaI
>< HaeII
>< CfoI
>< Bsp143II    > < MnlI    >< NlaIV
>< SfaNI  >< DdeI  >< BscBI
CGGCGCTAAC AAAGAAGGCA TCGTATGGGT TGCAACTGAG GGAGCCTTGA ATACACCCAA AGACCACATT
28500      28510      28520      28530      28540      28550      28560

>< NlaIV
>< Eco64I
>< BscBI
>< BanI
>< AciI
>< AccB1I  >< BbvI    >< Fnu4HI    >< MnlI
GGCACCCGCA ATCCTAATAA CAATGCTGCC ACCGTGCTAC AACTTCCTCA AGGAACAACA TTGCCAAAAG
28570      28580      28590      28600      28610      28620      28630

>< ThaI
>< MnlI
>< MaeII >< MvnI
>< MnlI    >< BstUI ><
>< Fnu4HI    >< Ksp632I  Bsp50I ><
>< BspWI    >< EarI    >< BsaAI>< AciI
>< MnlI    >< MnlI    >< AciI>< MboII    >< Eam1104I  AccII ><
GCTTCTACGC AGAGGGAAGC AGAGGCGGCA GTCAAGCCTC TTCTCGCTCC TCATCACGTA GTCGCGGTAA
28640      28650      28660      28670      28680      28690      28700

>< ScrFI
>< MvaI
>< EcoRII
>< Ecl136I
>< DsaV>< Fnu4HI
>< BstOI
>< BstNI
>< BsiLI
>< ApyI
>< BbvI
>< TaqI
>< AciI
TTCAAGAAAT TCAACTCCTG GCAGCAGTAG GGGAAATTCT CCTGCTCGAA TGGCTAGCGG AGGTGGTGAA
28710      28720      28730      28740      28750      28760      28770

> < ThaI
> < MvnI
>< HphI  >< MnlI
> < HinPII
> < Hin6I
>< HhaI
> < BstUI    >< RmaI
> < Bsp50I    >< MaeI
>< BbvI >< CfoI>< Fnu4HI
> < AccII>< BspWI
>< AluI
ACTGCCCTCG CGCTATTGCT GCTAGACAGA TTGAACCAGC TTGAGAGCAA AGTTTCTGGT AAAGGCCAAC
28780      28790      28800      28810      28820      28830      28840

> < PalI>< MaeIII
> < HaeIII
> < BsuRI    >< DdeI
>< Fnu4HI
>< DdeI
>< RsaI ><
>< MnlI
>< MaeII ><
>< Csp6I ><

```

FIGURE 13.67

81/116

```

      > < BshI   > < BbvI   >< MnlI >< BspWI   >< SfaNI   AfaI ><
AACAAACAAGG CCAAACTGTC ACTAAGAAAT CTGCTGCTGA GGCATCTAAA AAGCCTCGCC AAAAACGTAC
      28850      28860      28870      28880      28890      28900      28910

                                >< Tth111I
                                >< SinI
                                >< Sau96I
                                >< NspIV
                                >< NspHII
      > < MaeII
                                >< Eco47I
                                >< Cfr13I
                                >< BsmBI
                                >< BsiZI
                                >< StyI
                                >< Bme18I
                                >< EcoT14I
                                >< Eco130I
                                >< BssT1I
                                >< BsaJI
      >< RsaI
      >< MaeIII
      >< MaeII
      >< Csp6I
      >< AfaI
      TGCCACAAAA CAGTACAACG TCACTCAAGC ATTTGGGAGA CGTGGTCCAG AACAAACCCA AGGAAATTTC
      28920      28930      28940      28950      28960      28970      28980

      >< SinI
      >< Sau96I
      >< NspIV
      >< NspHII
      >< NlaIV
      >< Eco47I
      >< Cfr13I
      >< BsiZI
      >< BscBI
      >< Bme18I
      >< AvaII
      >< AsuI
      >< Pali
      >< MaeIII
      >< GdiII
      >< Fnu4HI
      >< EaeI
      >< BsuRI
      >< BshI
      >< AciI
      >< BspWI >
      >< BspWI
      GGGGACCAAG ACCTAATCAG ACAAGGAACT GATTACAAAC ATTGCCCGCA AATTGCACAA TTTGCTCCAA
      28990      29000      29010      29020      29030      29040      29050

      >< BsmI
      >< BscCI >< MnlI >< MaeIII
      >< NlaIII
      >< MaeIII
      >< NlaIII
      GTGCCTCTGC ATTCTTTGGA ATGTCACGCA TTGGCATGGA AGTCACACCT TCGGGAACAT GGC TGA CTTA
      29060      29070      29080      29090      29100      29110      29120

      >< XhoII
      >< Sau3AI
      >< NdeII
      >< MflI
      >< MboI
      >< FokI
      >< Tru9I
      >< NlaIV
      >< NlaIII
      >< MseI
      >< BscBI >< BstXI>< AlwI> < Bsp143I
      >< AspI
      >< BspWI ><
      TCATGGAGCC ATTAAATTGG ATGACAAAGA TCCACAATTC AAAGACAACG TCATACTGCT GAACAAGCAC
      29130      29140      29150      29160      29170      29180      29190

      EspI ><
      DdeI ><
      CelII ><
      Bpu1102I ><
      AluI ><
      >< HgaI
      ATTGACGCAT ACAAACATT CCCACCAACA GAGCCTAAAA AGGACAAAAA GAAAAAGACT GATGAAGCTC
      29200      29210      29220      29230      29240      29250      29260

```

FIGURE 13.68

```

                >< P1eI
                >< MboII
    >< Fnu4HI
    >< BspWI
    >< BsmAI
    >< Alw26I
    >< AciI
    AGCCTTTGCC GCAGAGACAA AAGAAGCAGC CCACTGTGAC TCTTCTTCCT GCGGCTGACA TGGATGATTT
    29270      29280      29290      29300      29310      29320      29330

                >< Fnu4HI >< BbvI >< AciI >< NlaIII
                >< NlaIII >< HinfI >< HinfI >< NlaIII ><
    >< FokI
    >< AluI >< TfiI>< DdeI >< BspHI
    CTCCAGACAA CTTCAAAATT CCATGAGTGG AGCTTCTGCT GATTCAACTC AGGCATAAAC ACTCATGATG
    29340      29350      29360      29370      29380      29390      29400

                >< MaeII >< AccI
    ACCACACAAG GCAGATGGGC TATGTAAACG TTTTCGCAAT TCCGTTTACG ATACATAGTC TACTCTTGTG
    29410      29420      29430      29440      29450      29460      29470

                >< Tru9I
                >< Tru9I
                >< MseI
    >< MseI
    >< XmnI
    >< EcoRI>< MaeIII
    >< Asp700I >< BsgI
    CAGAATGAAT TCTCGTAACT AAACAGCACA AGTAGGTTTA GTTAACTTTA ATCTCACATA GCAATCTTTA
    29480      29490      29500      29510      29520      29530      29540

                XorII >
                TthHB8I >
                TaqI >
                Sau3AI ><
                RsaI ><
    >< ThaIPvuI >
    NdeII ><
    >< MnlI
    >< MvnIMcrI >
    MboI ><
    DpnII ><
    DpnI ><
    Csp6I ><
    >< BstUI
    >< HaeIII BspCI >
    BspAI ><
    >< TthHB8I >< Bsp50I
    >< Pali Bsp143I ><
    >< BsuRI BsiEI >
    >< BshIAfaI ><

    >< MnlI
    >< MaeIII
    ATCAATGTGT AACATTAGGG AGGACTTGAA AGAGCCACCA CATTTTCATC GAGGCCACGC GGAGTACGAT
    29550      29560      29570      29580      29590      29600      29610

                >< SduI
                >< NspII
                >< MboII >< VspI
                >< Ksp632I >< Eco24I >< Tru9I
    >< RsaI >< RmaI >< Fnu4HI >< Bsp1286I >< MseI
    >< Csp6I >< MaeI >< EarI >< BmyI >< AsnI
    >< AfaI >< BbvI >< AluI>< Eam1104I >< BanII >< AseI

```

FIGURE 13.69



83/116

CGAGGGTACA GTGAATAATG CTAGGGAGAG CTGCCTATAT GGAAGAGCCC TAATGTGTAA AATTAATTTT  
29620 29630 29640 29650 29660 29670 29680

&gt;&lt; Tru9I &gt;&lt; DdeI

&gt;&lt; MseI &gt;&lt; BfrI

&gt;&lt; NlaIII &gt; &lt; AluI

AGTAGTGCTA TCCCCATGTG ATTTTAATAG CTTCTTAGGA GAATGACAAA AAAAAAAAAA AAAAAA  
29690 29700 29710 29720 29730 29740

Sérologie SRAS : Technique N Indirect (1ère série)

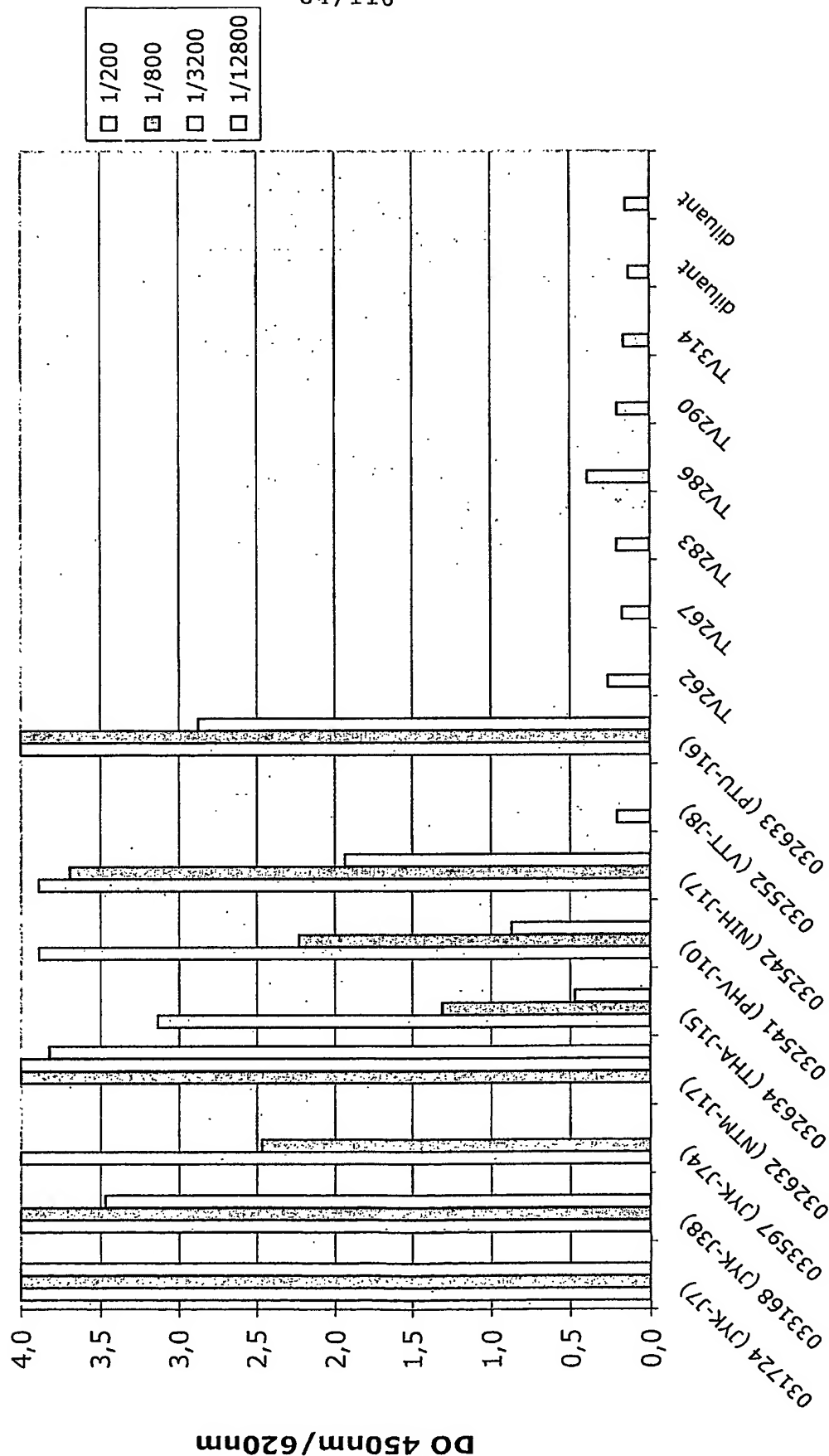


FIGURE 14

Sérologie SRAS : Technique N Indirect (2ème série)

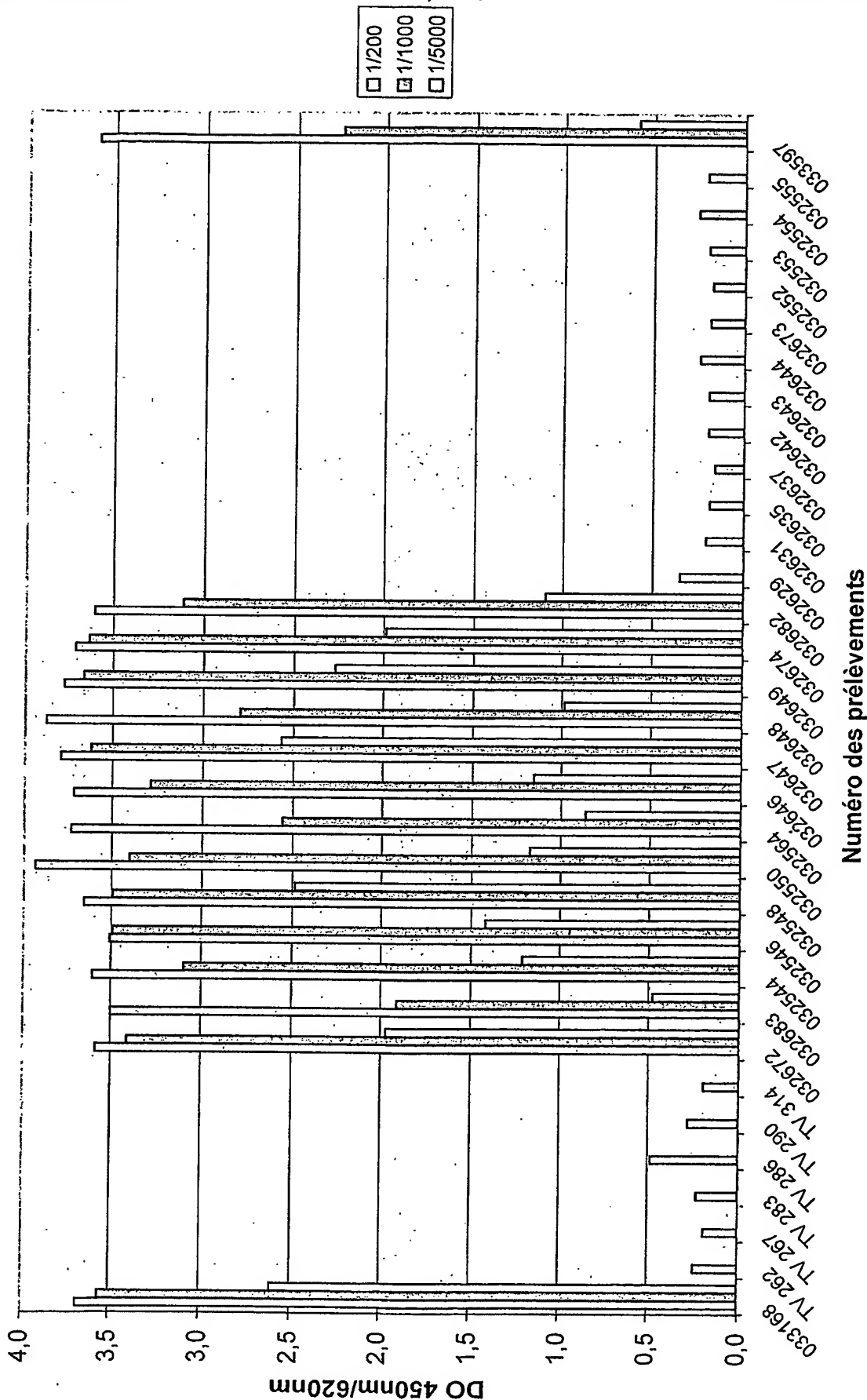


FIGURE 15

Sérologie SRAS : Technique Double Epitope (1ère série)

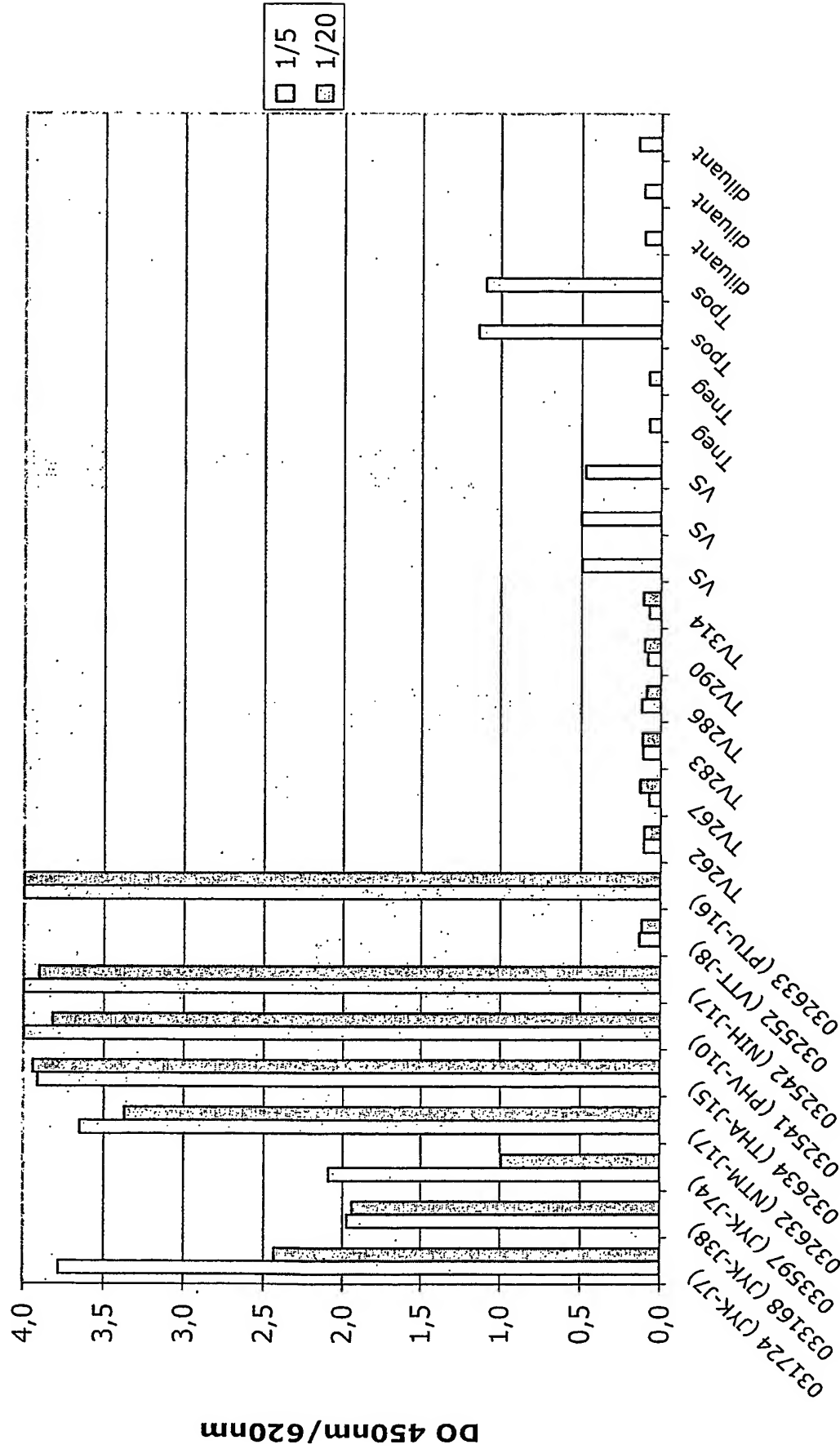


FIGURE 16

Sérologie SRAS : Technique Double Epitope (2ème série)

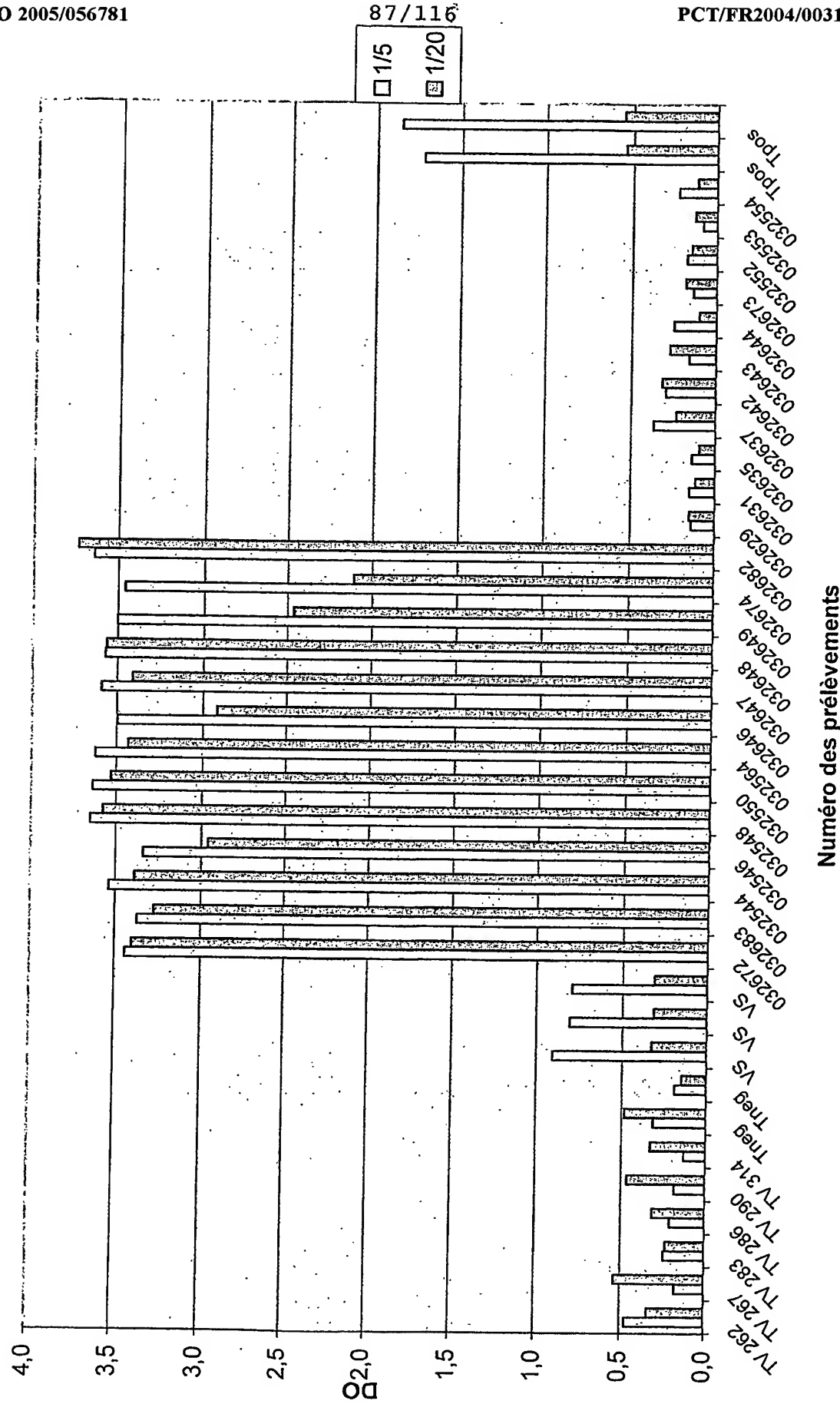


FIGURE 17

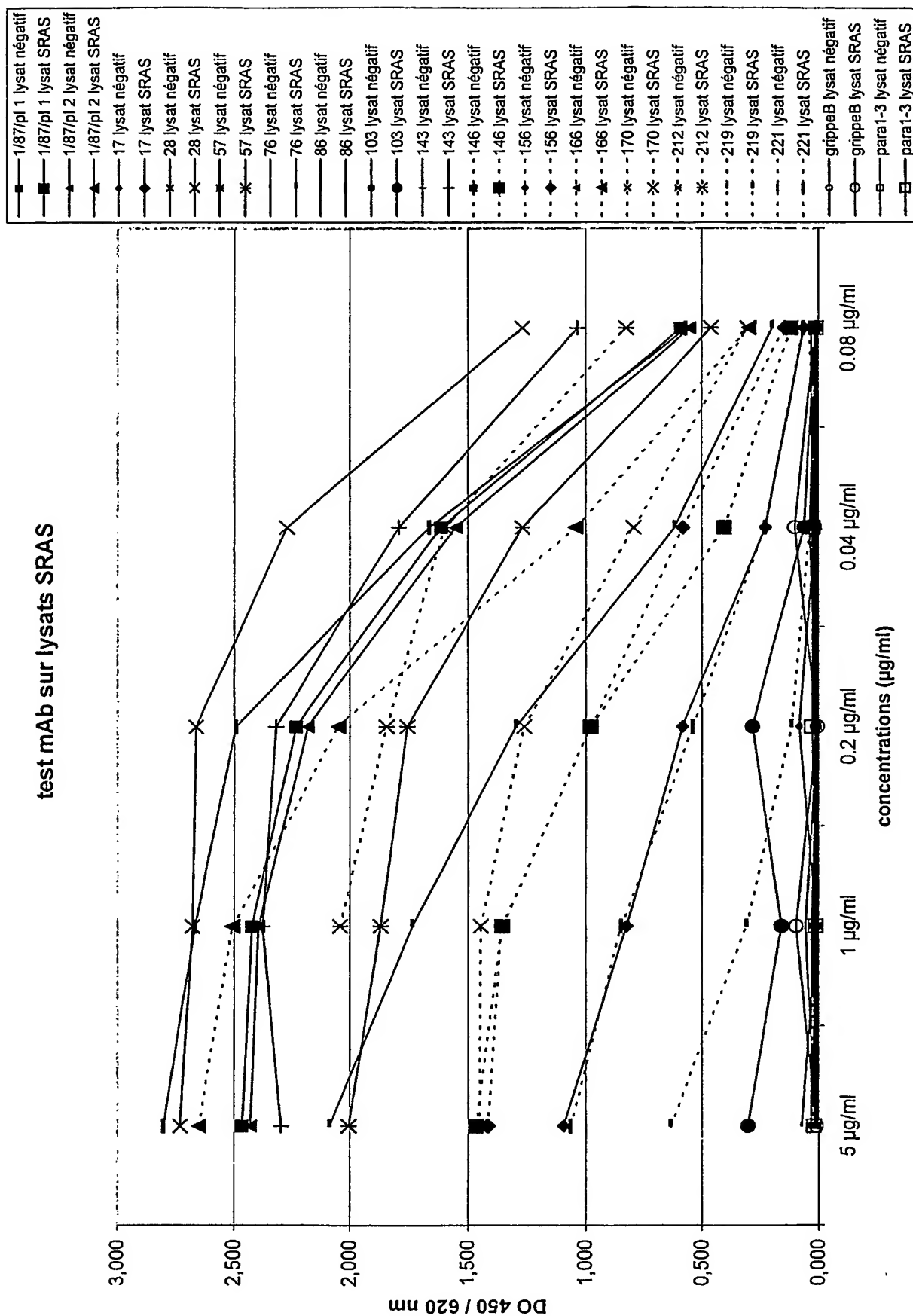


FIGURE 18

Test mAb sur lysats HCoV-229E

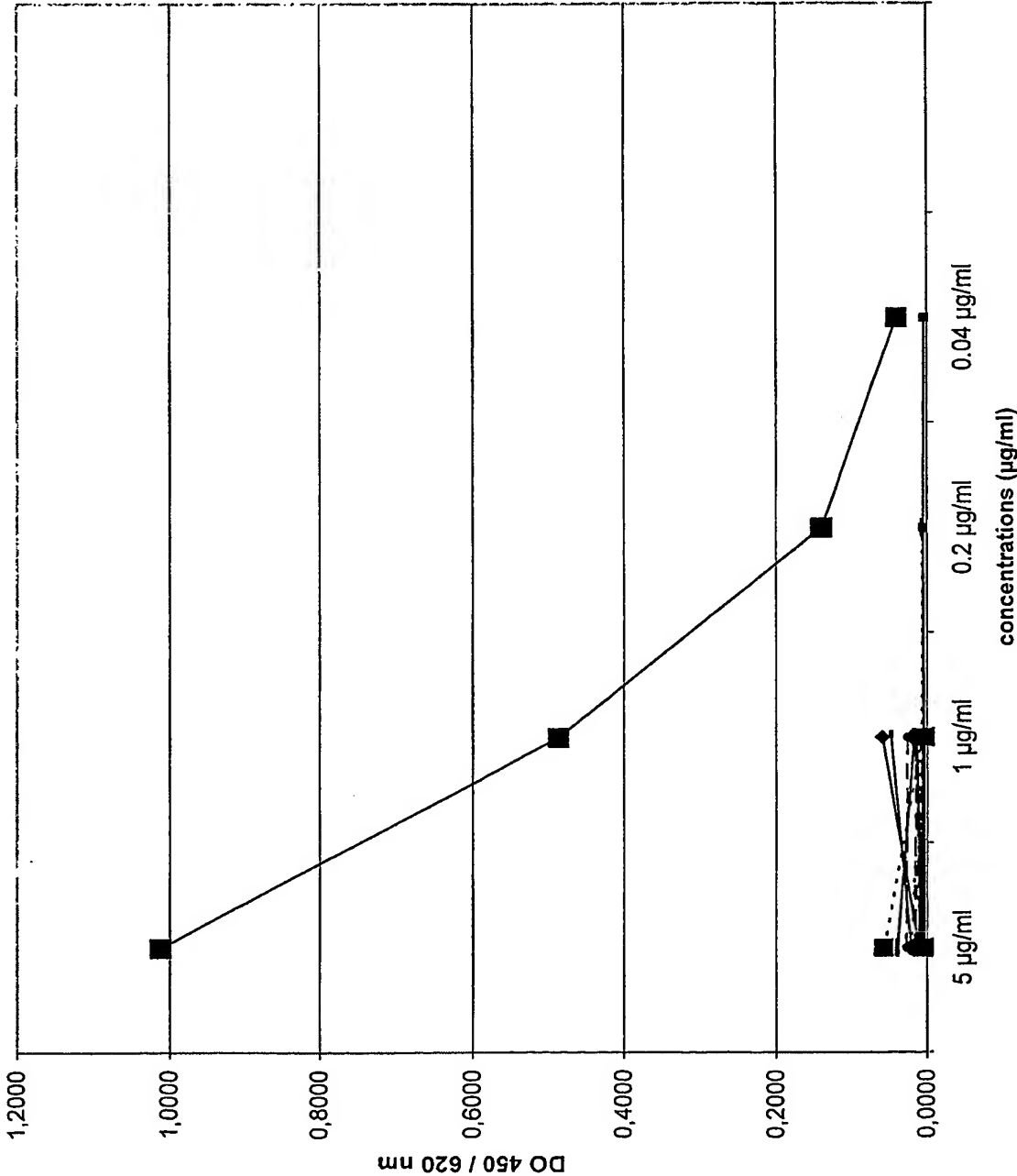


FIGURE 19

90/116

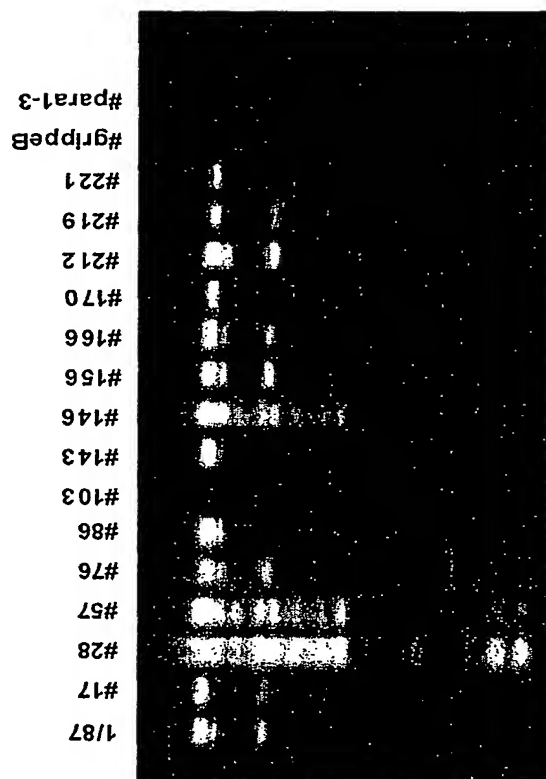


FIGURE 20



91/116

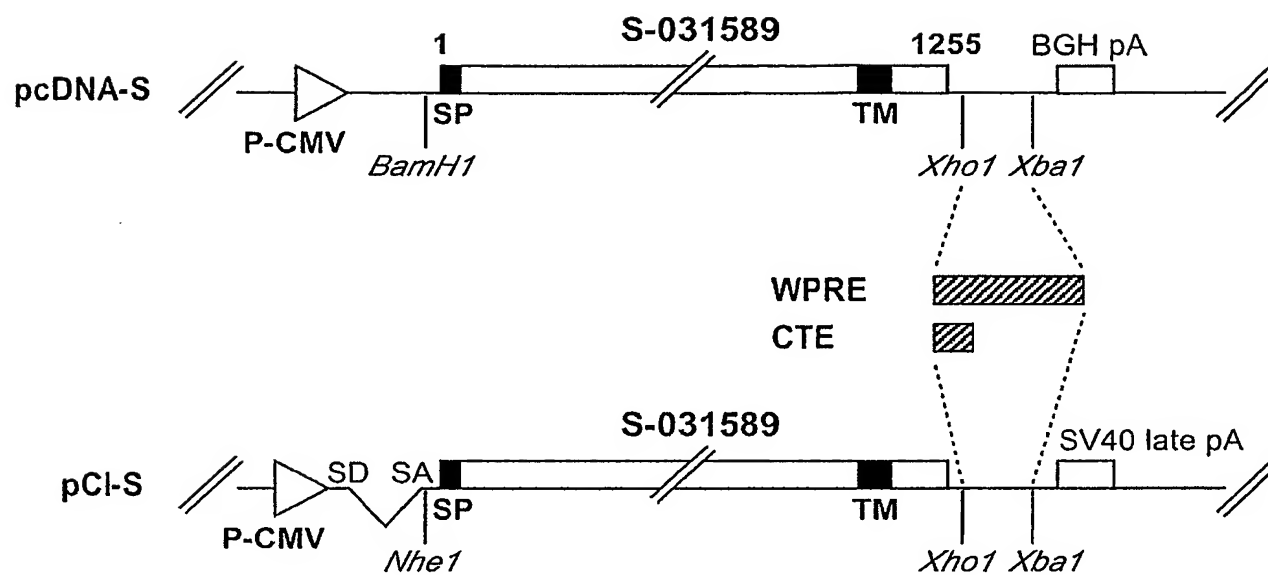
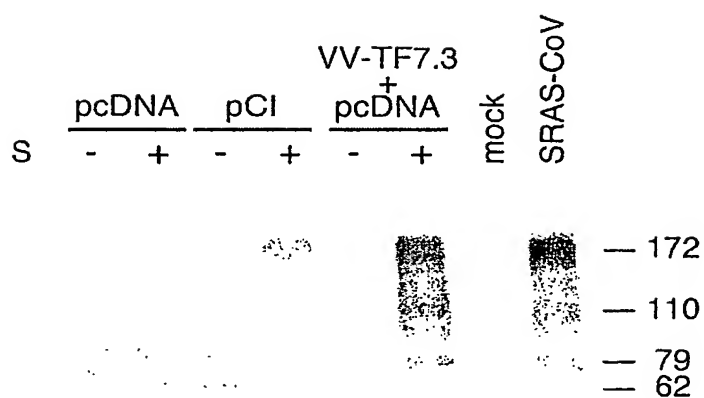
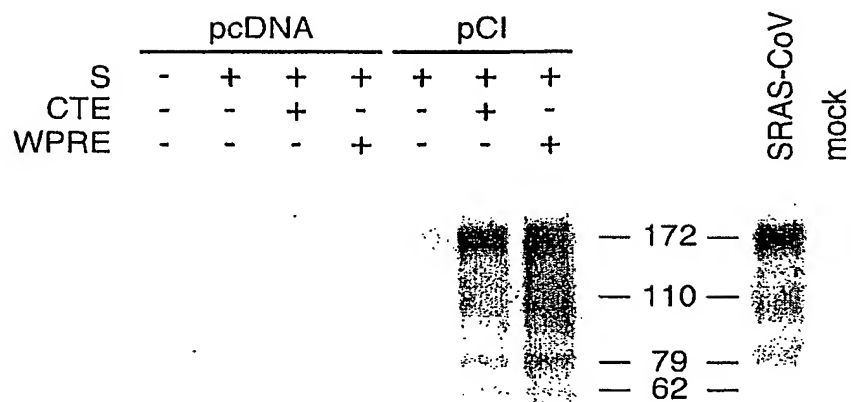


FIGURE 21



93/116

A.



B.

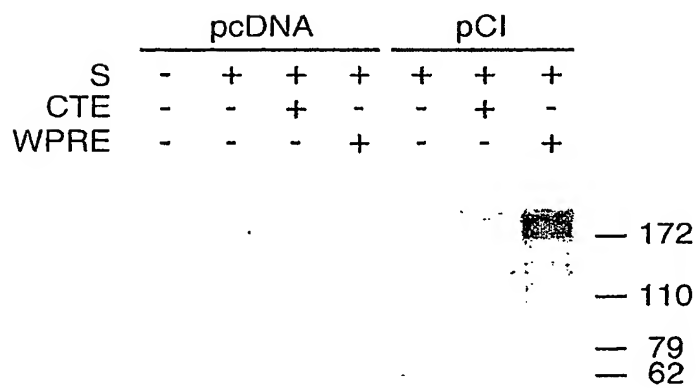


FIGURE 23

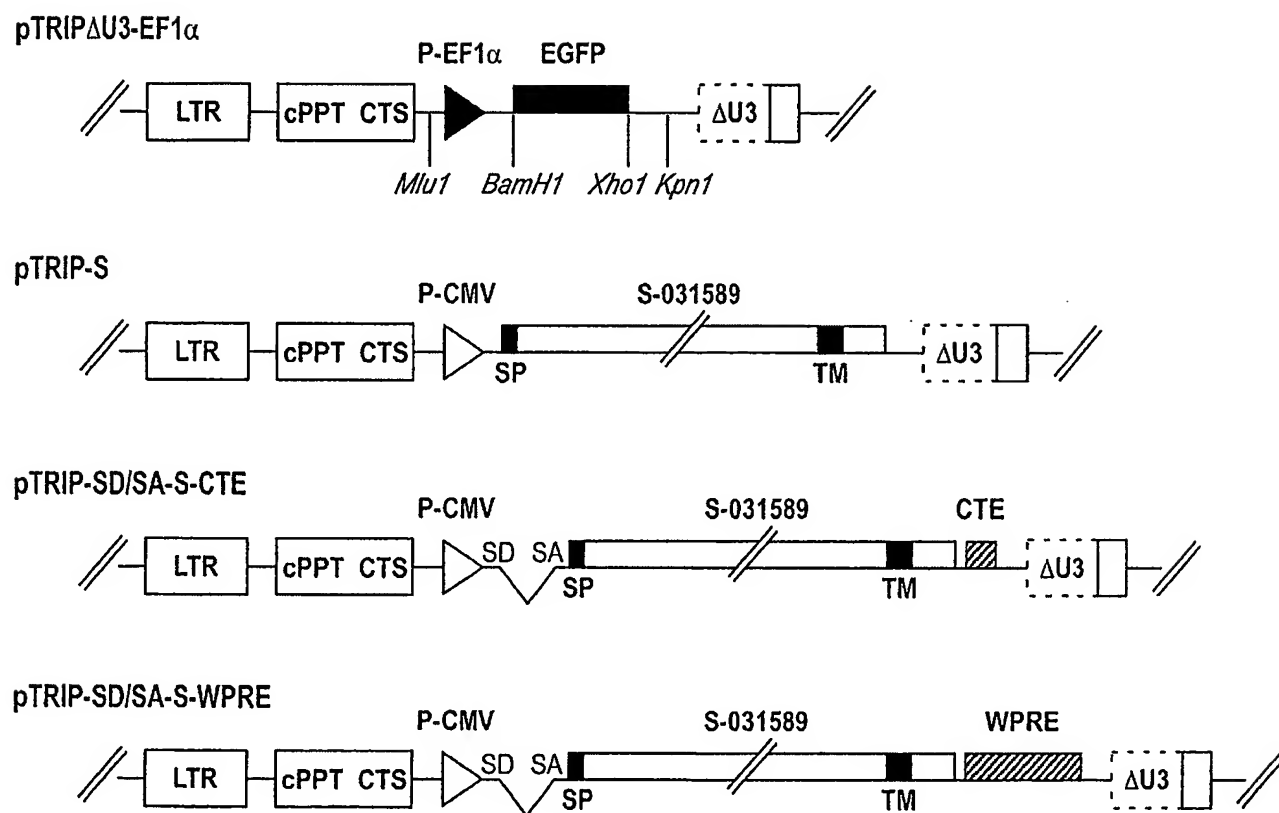


FIGURE 24

95/116

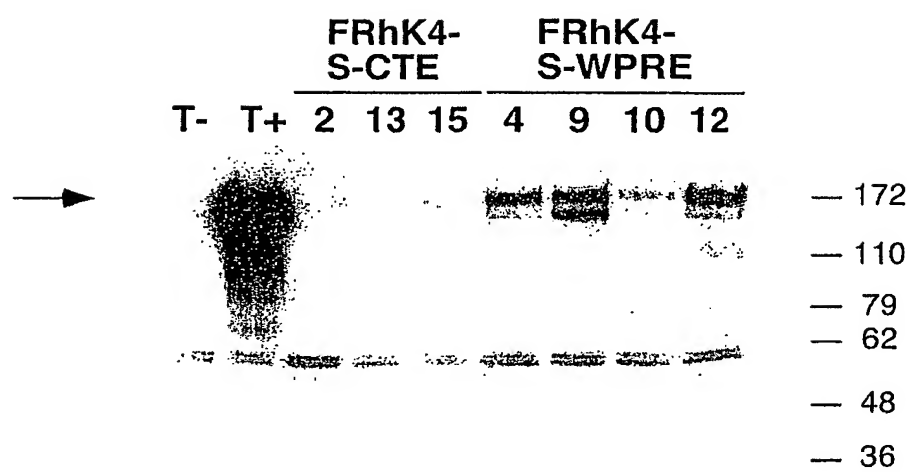


FIGURE 25

96/116

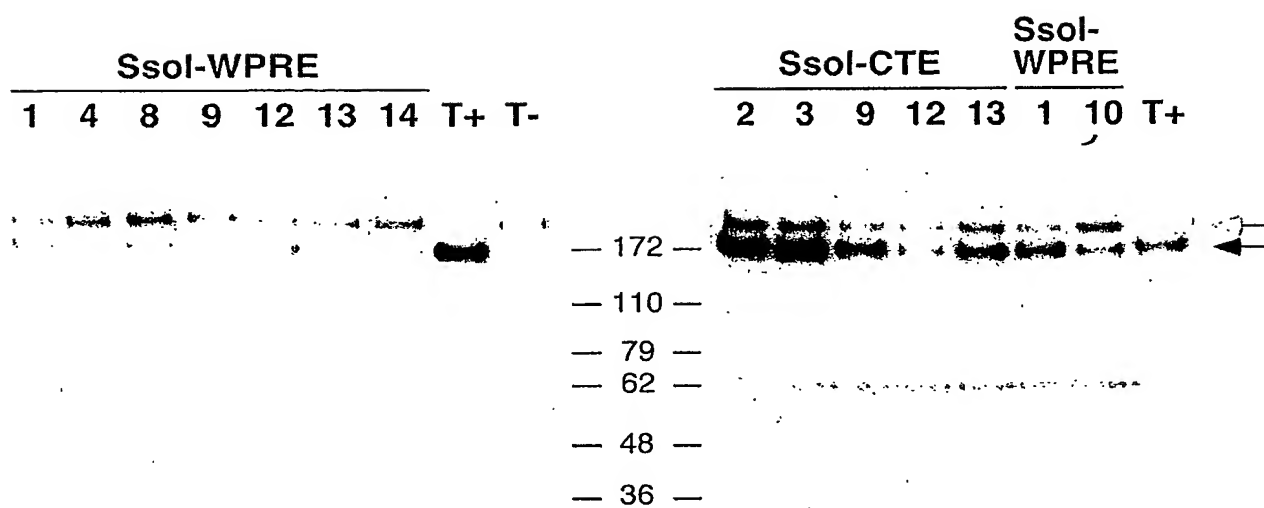


FIGURE 26

97/116

A.

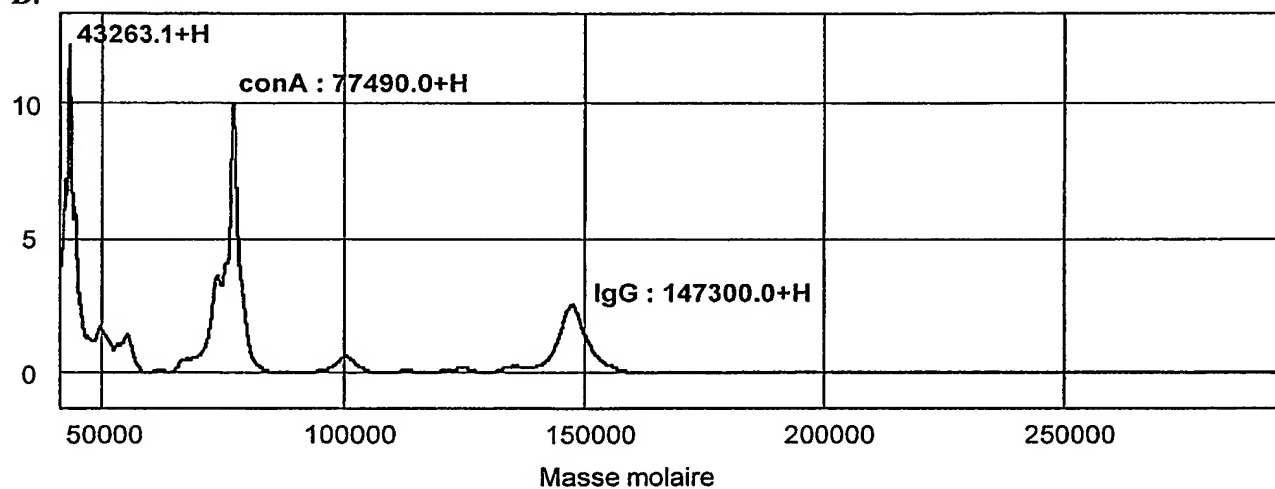
MM (ng)			Ssol (μg)			
120	60	30	2	.5	.13	.03

205 —  
116 —

97 —  
80 —  
66 —

55 —  
45 —

B.



C.

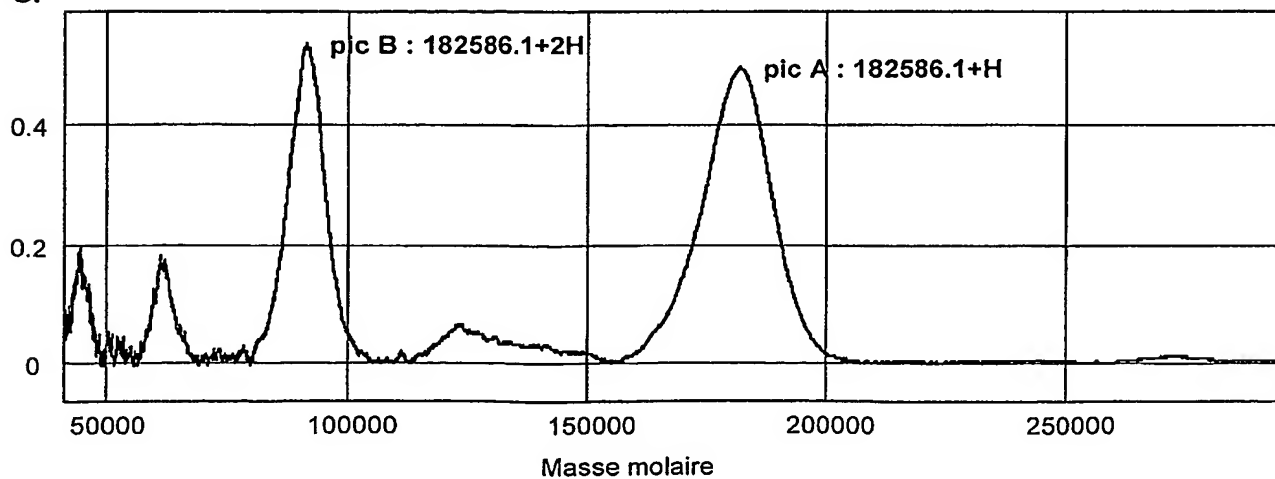


FIGURE 27 A-C

D.

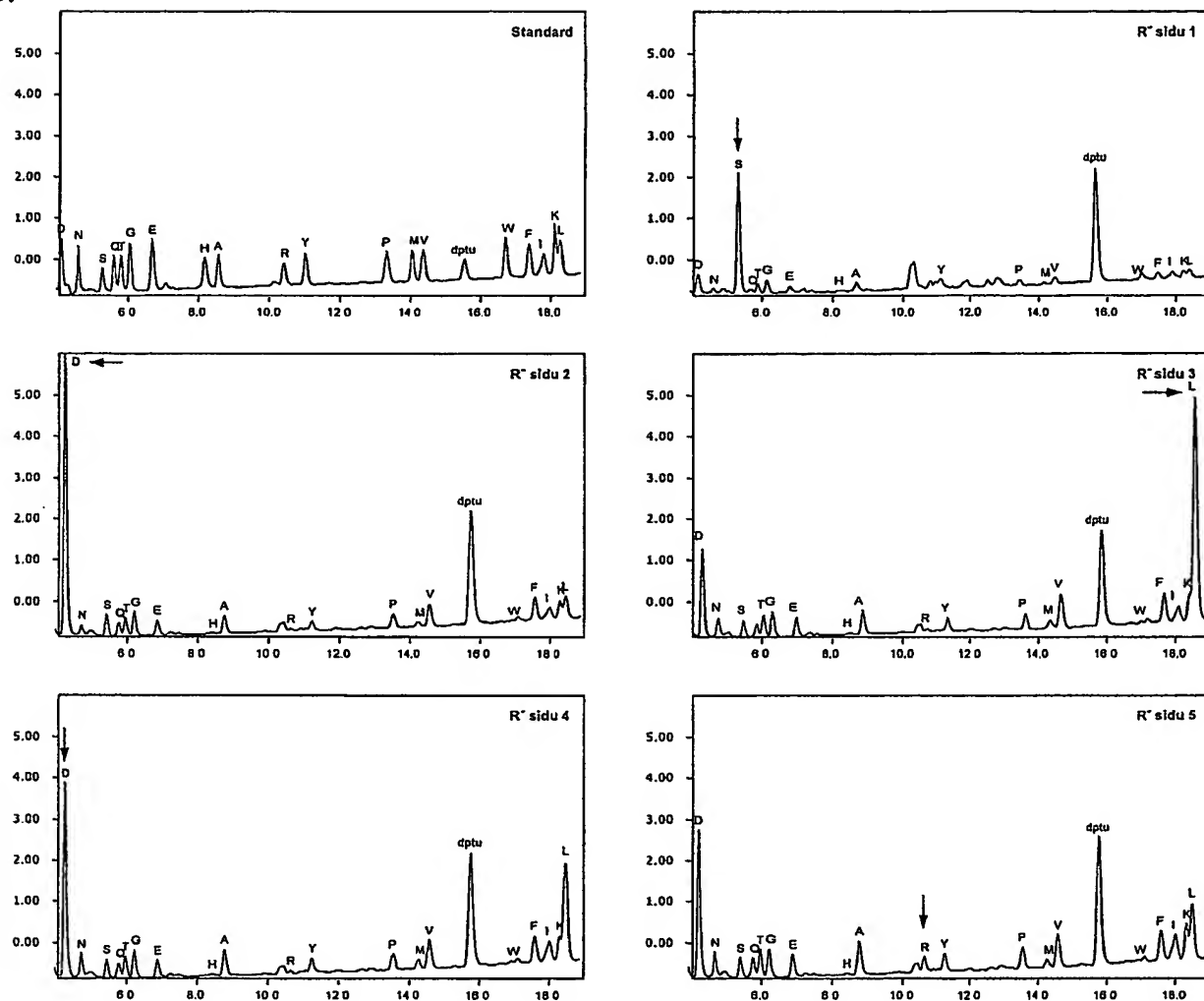
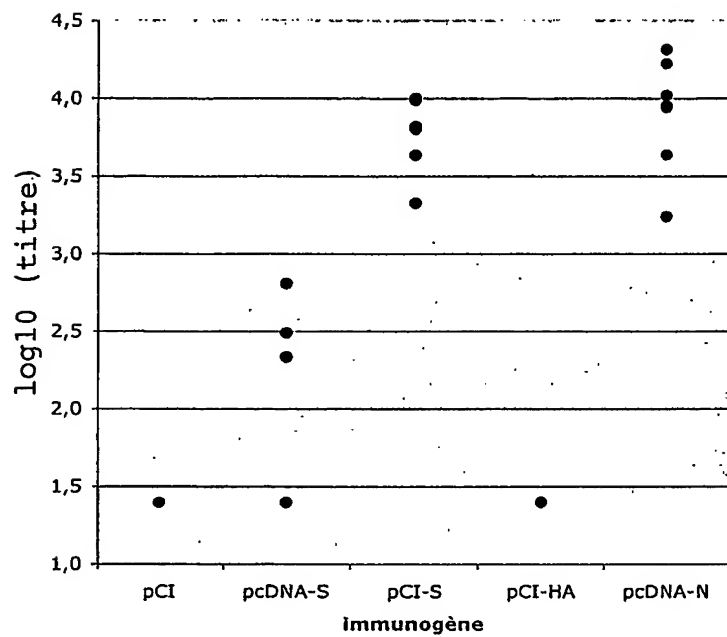


FIGURE 27 D



99/116

A.



B.

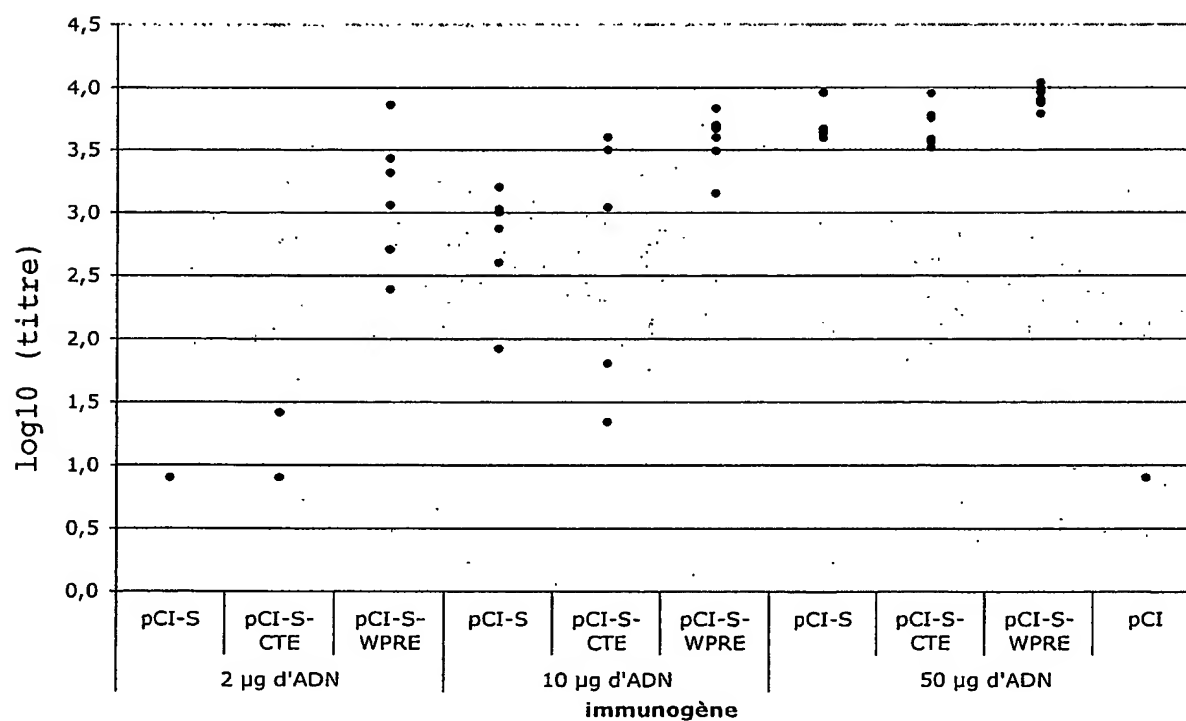
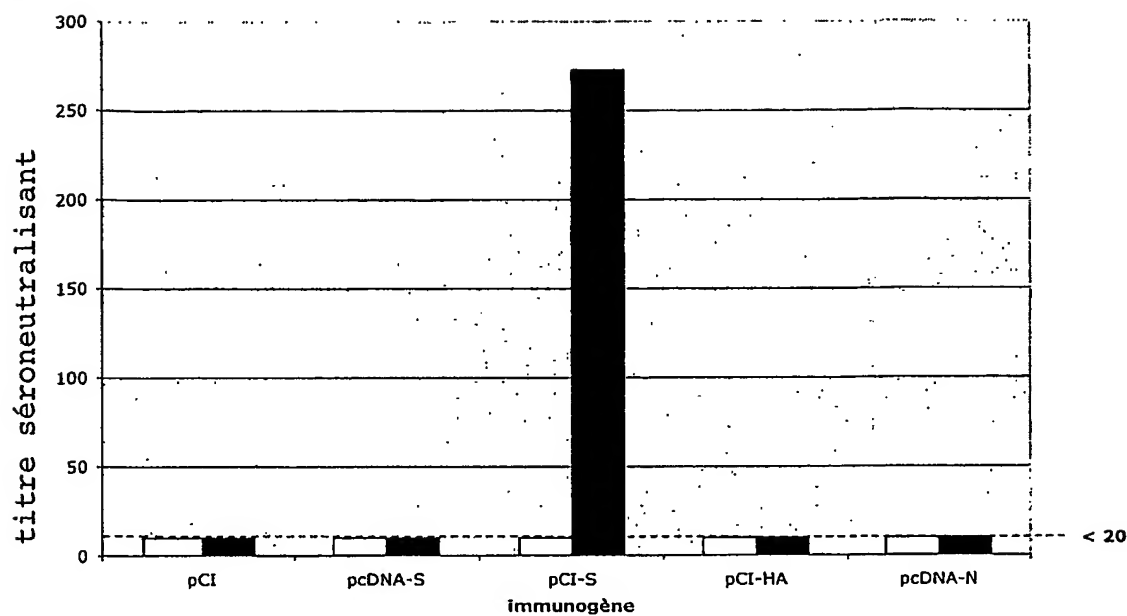


FIGURE 28

A.



B.

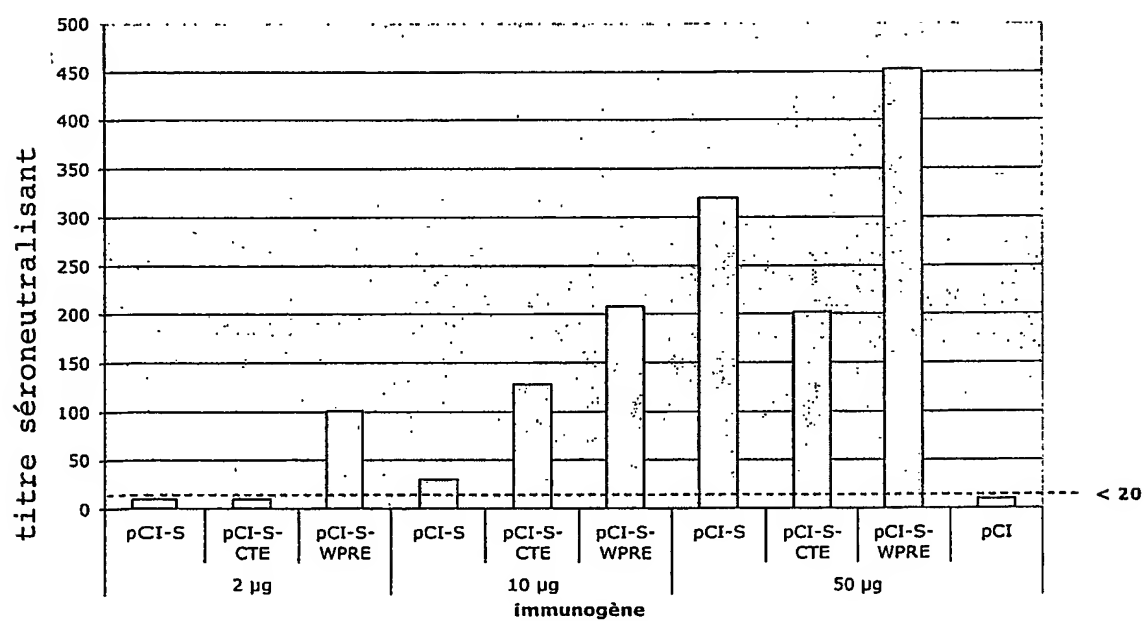


FIGURE 29

101/116

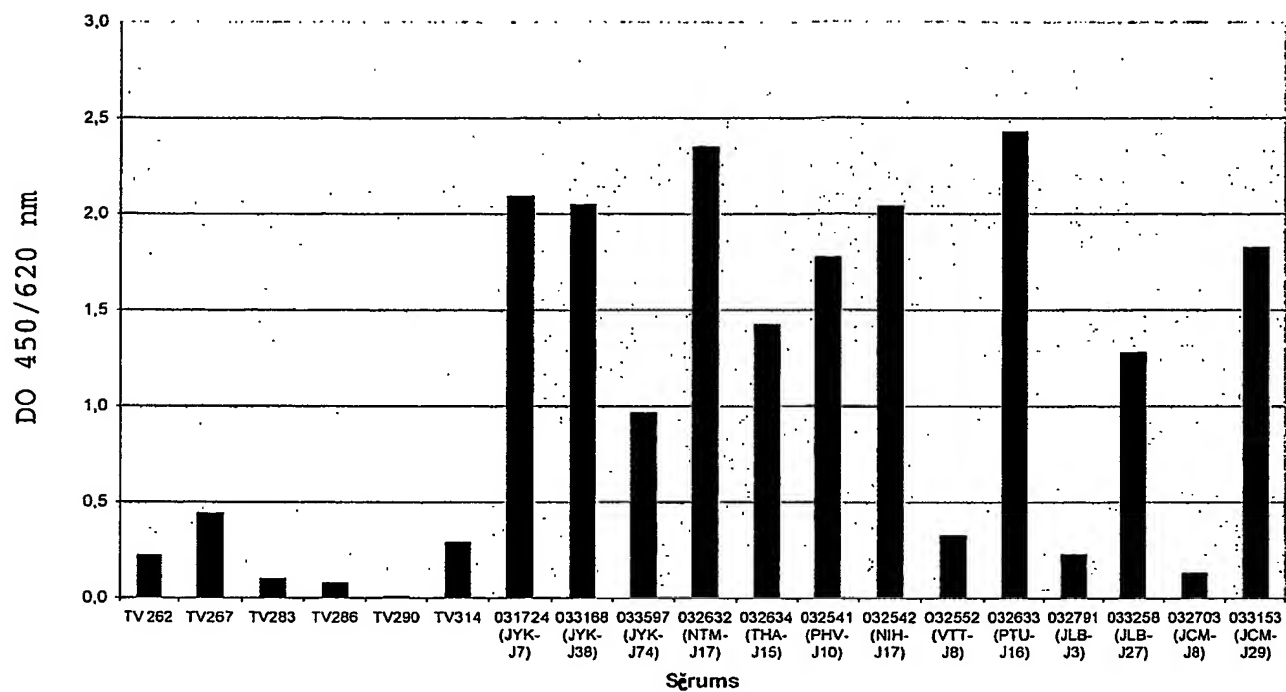


FIGURE 30

102/116

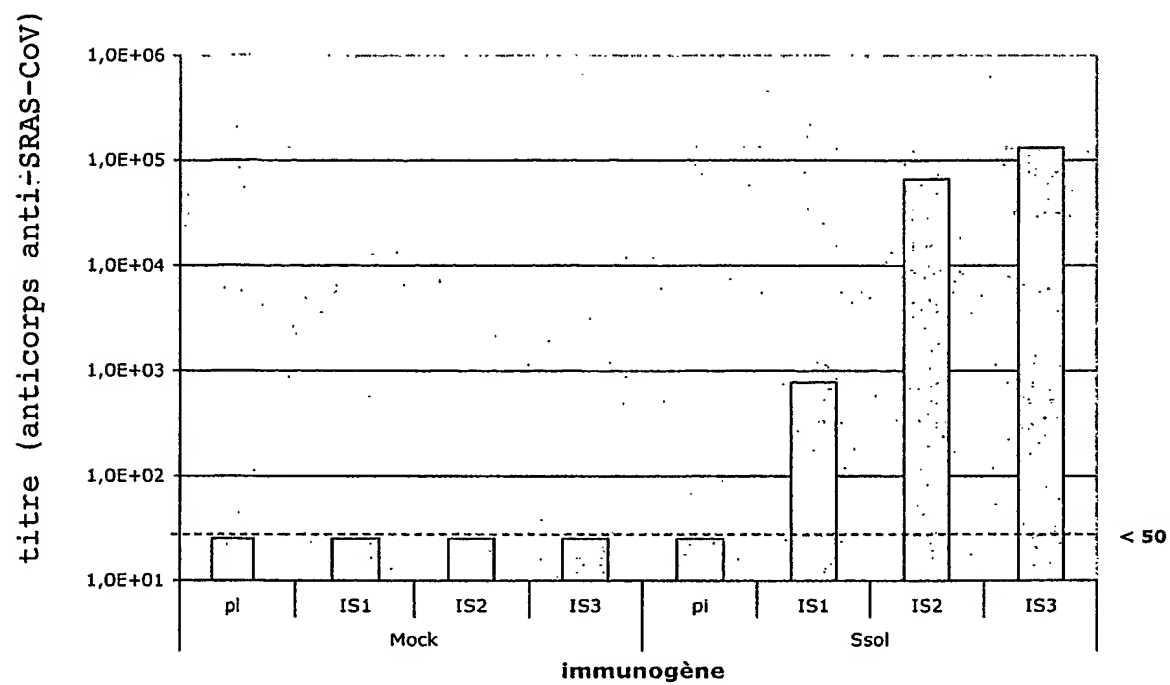


FIGURE 31

### FIGURE 32.1



105/116

I-3059 S-040530	2697 2620	GGTGGCTGGCGCTGCTCTTCAAATACCTTTTGCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGC "A"C"A"C"C"G"G"C"C"C"C""G""C"CC""C""
I-3059 S-040530	2757 2680	ATTGGAGTTACCCAAATGTTCTCTATGAGAACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAAC "C"C"G""G"C"G"G"C""G"G"G""G"C""
I-3059 S-040530	2817 2740	AAGGCGATTAGTCAAATTCAGAATCACTTACAACAACATCAACTGCATTGGGCAAGCTG ""C"C"C"C"G"C"G"GAGC"G"C""CAGC"C"CC""
I-3059 S-040530	2877 2800	CAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTTAAACAACTTAGCTCT "G""G""G""C"C"G"CC"G""C"G"G"G"G"G"AGC
I-3059 S-040530	2937 2860	AATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAG "C"C"C"C"CAGCTC""G"C"C""GAGCA"G"G"C""G""
I-3059 S-040530	2997 2920	GCGGAGGTACAAATTGACAGGCTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTA "C"A"G"G"C""C""G"C"C"AC"C"G"GTC""G"G""C"G
I-3059 S-040530	3057 2980	ACACAACAACTAATCAGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCTAATCTTGCTGCTACTAAA "C"G"G"G""G""A"C"C"G""C""CAGC"C""G"C"C"C"G
I-3059 S-040530	3117 3040	ATGTCTGAGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGTGGAAAGGGCTACCAC ""AGC""C"G"G"C"GAGC"G""G""C"C"C""T""
I-3059 S-040530	3177 3100	CTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCGCATGGTGTTGTCTTCTACATGTCACGTATGTG "G""AG""C"G"C""C"C"G"G""G""G"C"G"C"C""
I-3059 S-040530	3237 3160	CCATCCCAGGAGAGGAACTTCACCACAGCGCCAGCAATTTGTCTATGAAGGCAAAGCATAC "TAG""C""C""C""C""C""C""C""C""G""G"C""
I-3059 S-040530	3297 3220	TTCCCTCGTGAAGGTGTTTTGTGTTTAAATGGCACTTCTTGTTTATTACACAGAGGAAC ""C"G"G"C"G"C""C""CAGC""C"C"C"C"C""
I-3059 S-040530	3357 3280	TTCTTTTCTCCACAAATAATTACTACAGACAATACATTTGTCTCAGGAAATTGTGATGTC ""CAGC"C"G"C"C"C""C""C"C"G"C"C"C""G
I-3059 S-040530	3417 3340	GTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCTGAGCTTGACTCATTC "G"C""C""C""C""C""C""C""G"C""C""G""AGC""
I-3059 S-040530	3477 3400	AAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATACATCACCAGATGTTGATCTTGGCGAC "G"G""A""G"C"C"C"C"C"C"G"C"G""T
I-3059 S-040530	3537 3460	ATTTCAAGGCATTAACGCTTCTGTGCTCAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCTCAATGAG "CAGC""C""C"G"G""C"G"G"G"C""A"A"G"C"A
I-3059 S-040530	3597 3520	GTCGCTAAAAATTTAAATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAA "G"C"G"CC"G"C"GAGC"G"C""G"G"GC""C"G"C""G
I-3059 S-040530	3657 3580	TATATTAAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTC "C"C"G""C""C"G""G""C""C"C"G"C""G
I-3059 S-040530	3717 3640	ATGTTTACAACTCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGCCTCAAGGGTGCATGC ""G""C""G"C""C""C""C""C""T""G""A""C"C""
I-3059 S-040530	3777 3700	TCTTGTGGTTCCTTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCTGAGCCAGTTCTCAAGGGTGTG AGC""CAGC""C""C""C""AGC""C"G"G""C"G
I-3059 S-040530	3837 3760	AAATTACATTACACATAAACGAACCTTATGGATTGTTTATGAGATTTTACTCTTGGAT "GC"G"C""C"G"__""CGA"
I-3059 S-040530	3897	CAATTACTGCACAGCCAGTAAAAATTGACAAATGCTTCTCCTGCAAGT

**FIGURE 32.3**

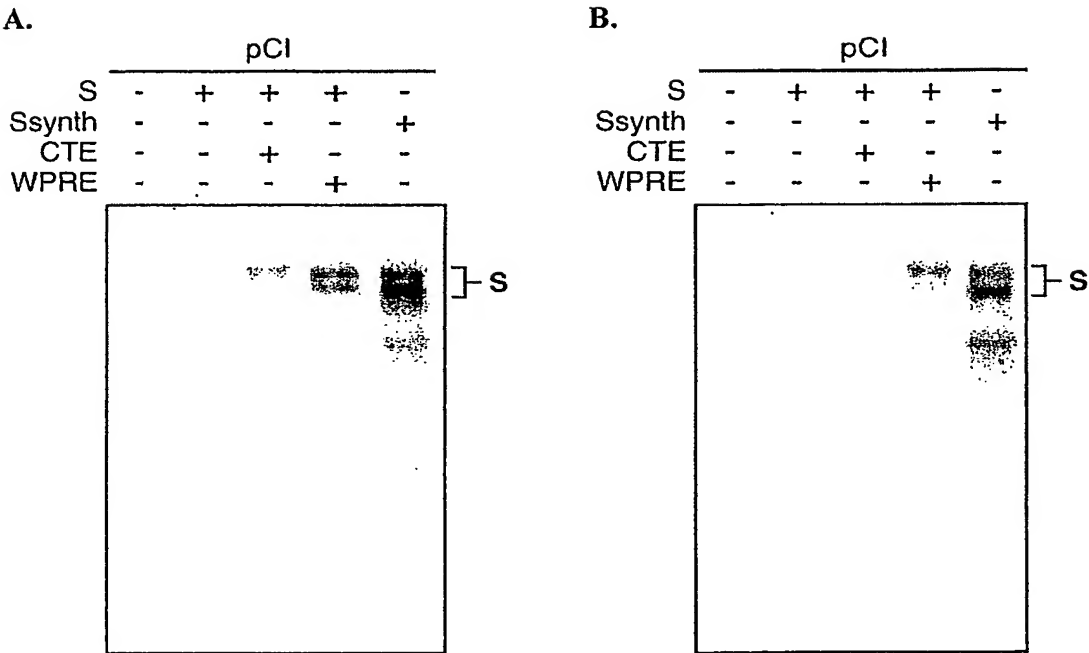
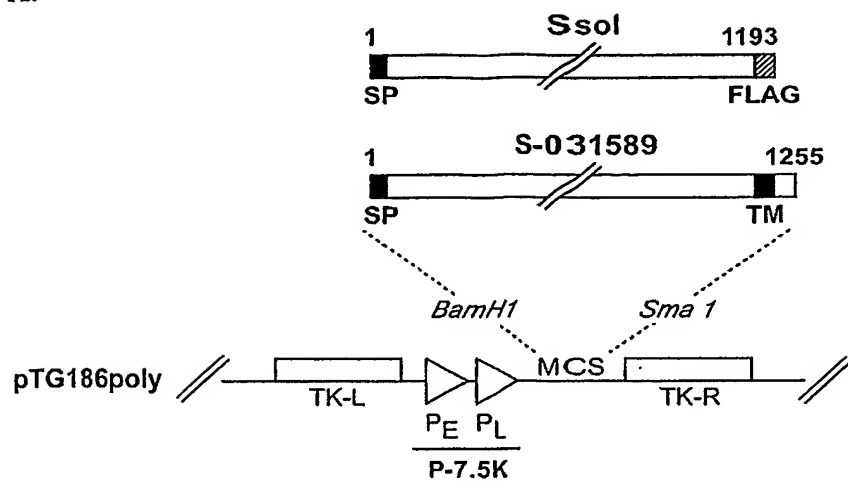


FIGURE 33

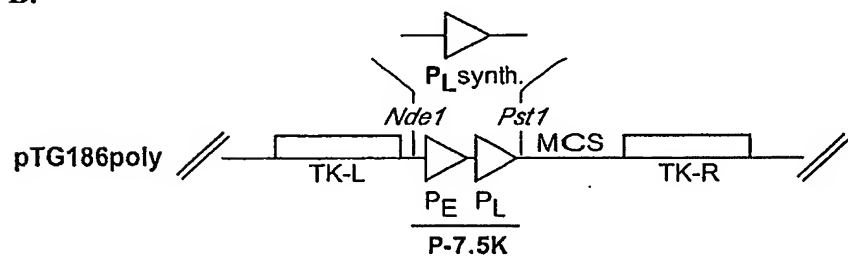


107/116

A.



B.



C.

CATATG AGC [T]<sub>20</sub>GGCATATAAATA GACTC GGCGCGCC AT CTGCAG  
*Nde*I                      promoteur 480                      *Asc*I                      *Pst*I

FIGURE 34 A-C

108/116

D.

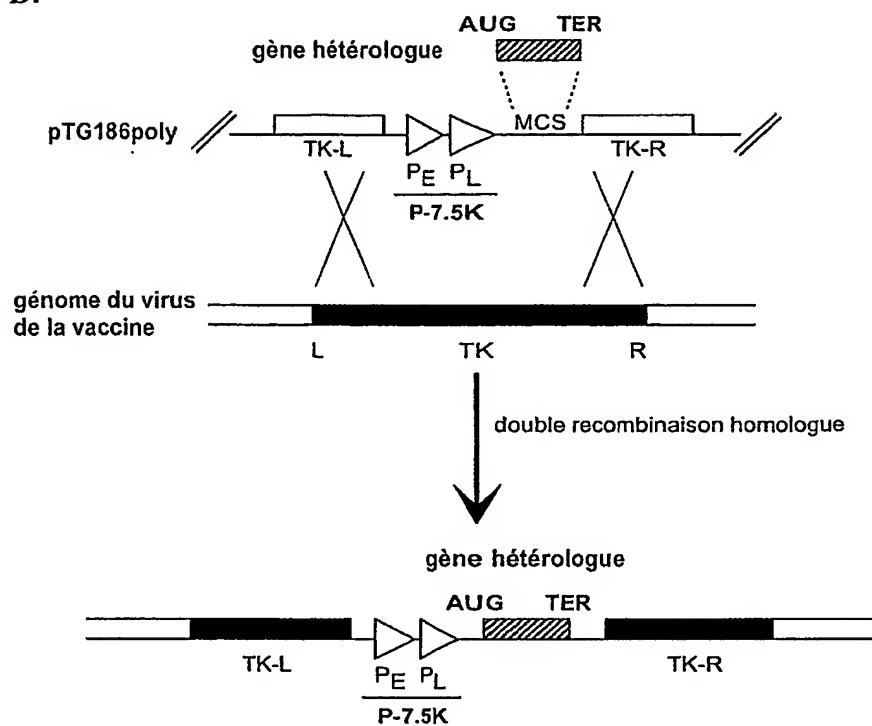
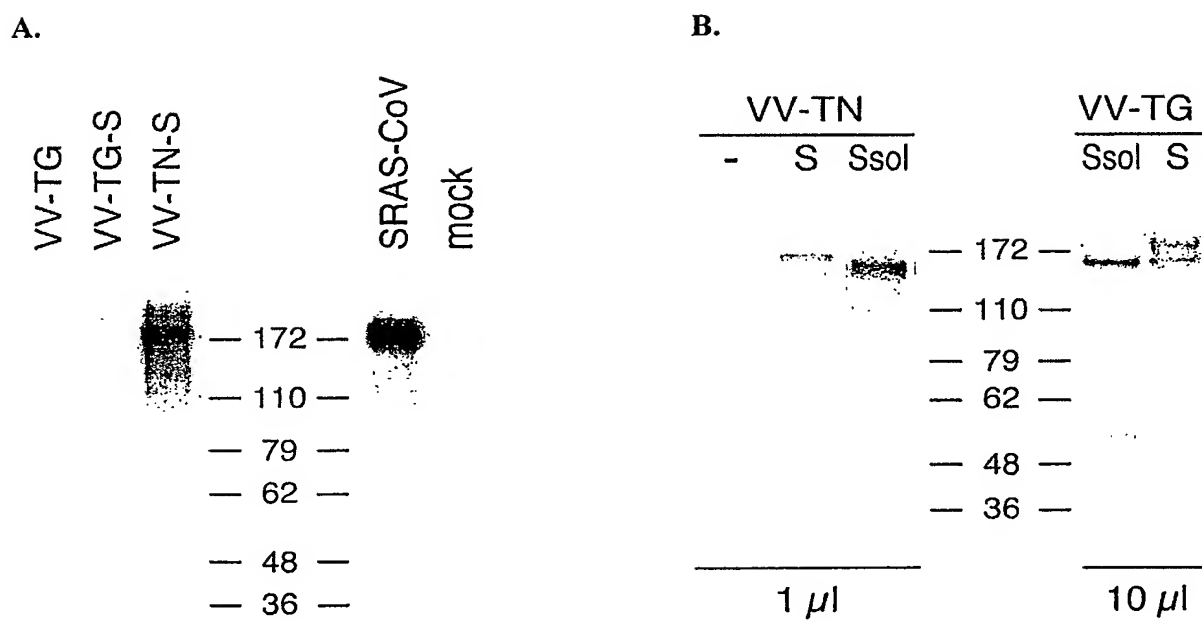


FIGURE 34 D

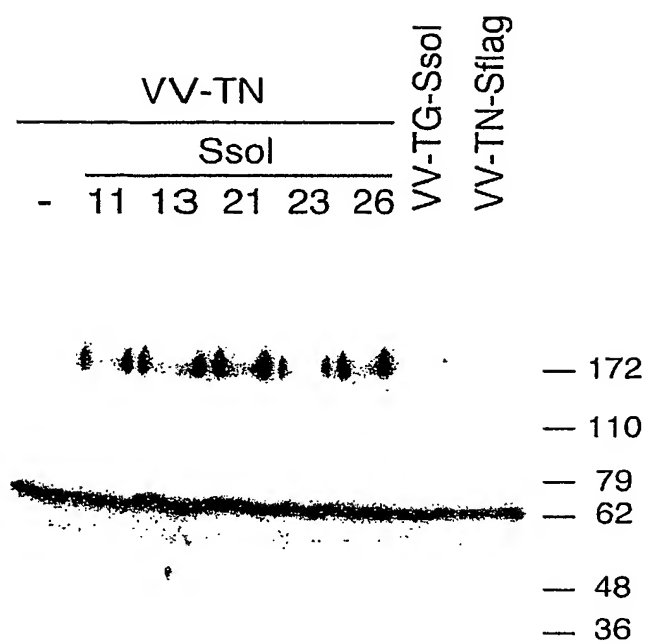
109/116



**FIGURE 35**

110/116

A.



B.

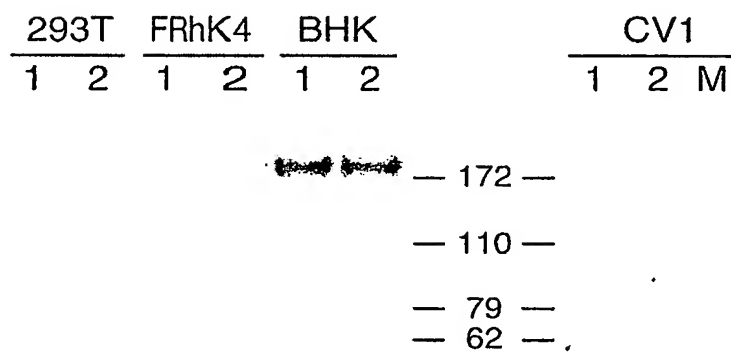


FIGURE 36

111/116

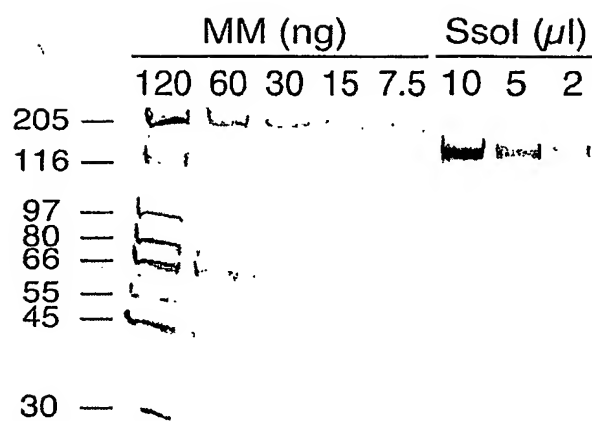


FIGURE 37

112/116

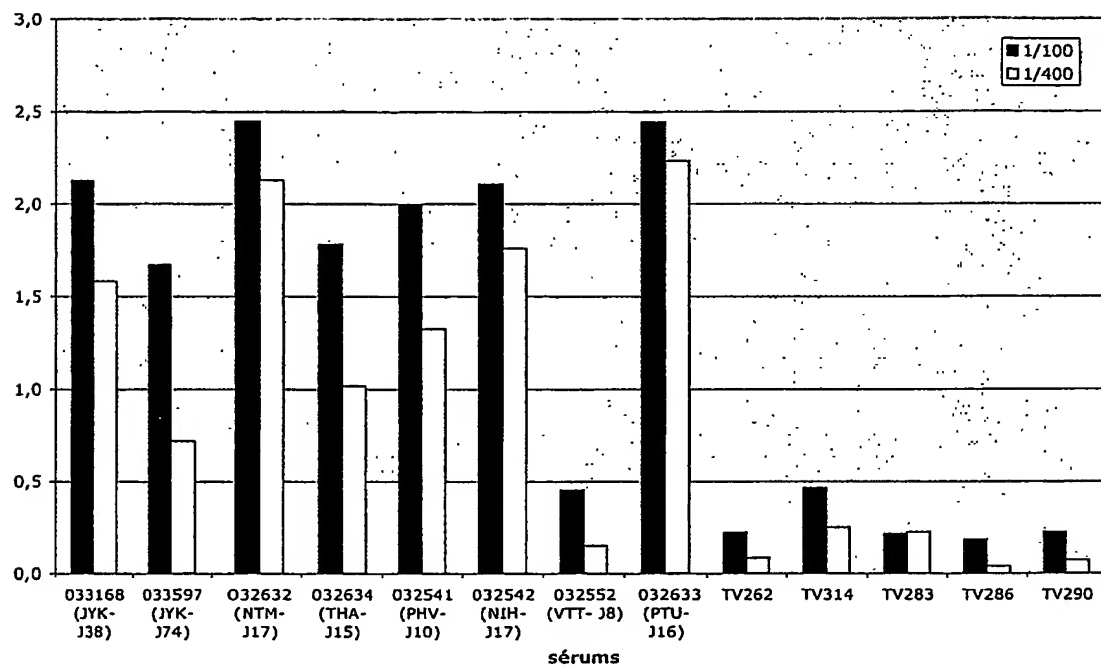
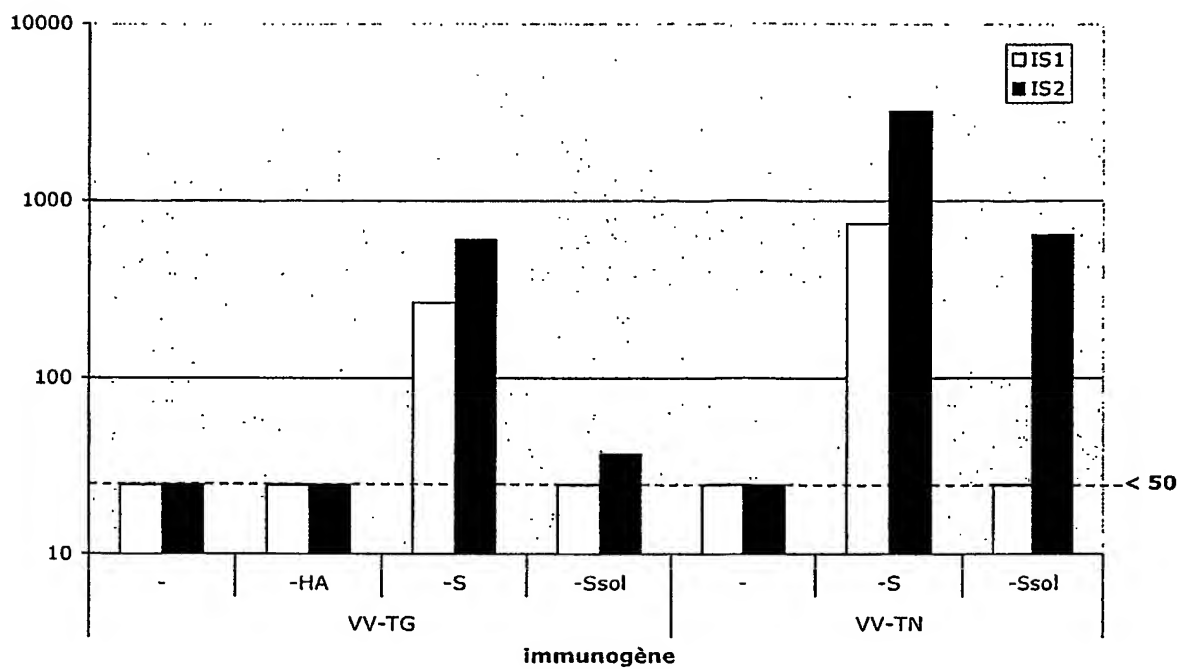


FIGURE 38

113/116

A.



B.

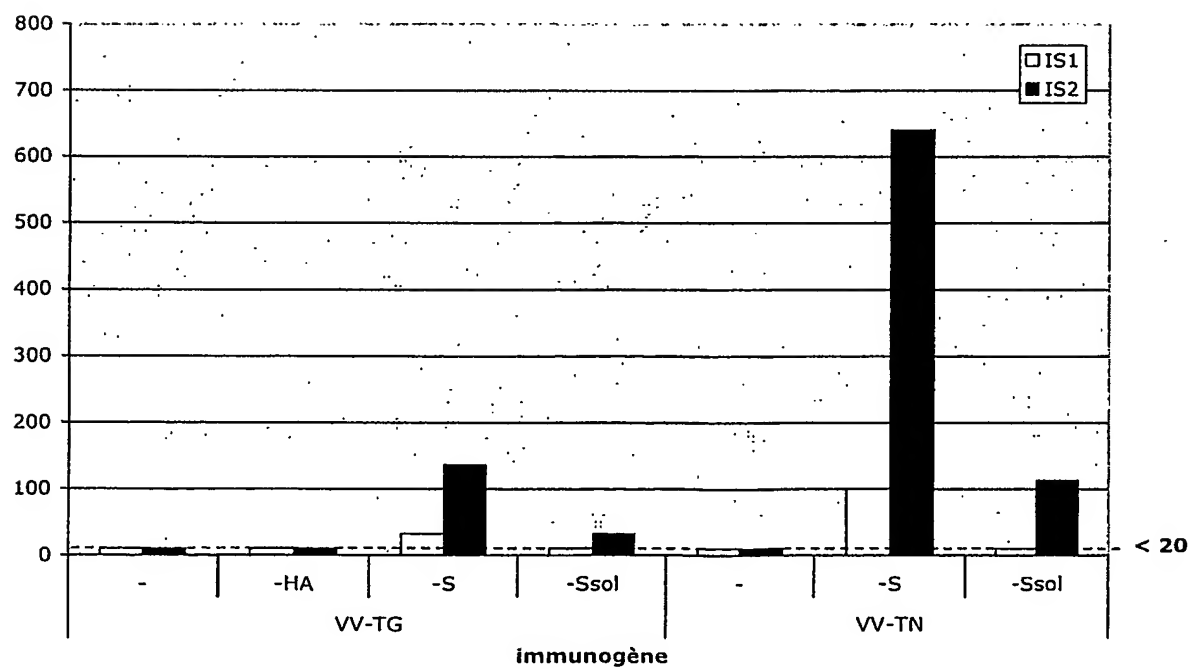


FIGURE 39

114/116

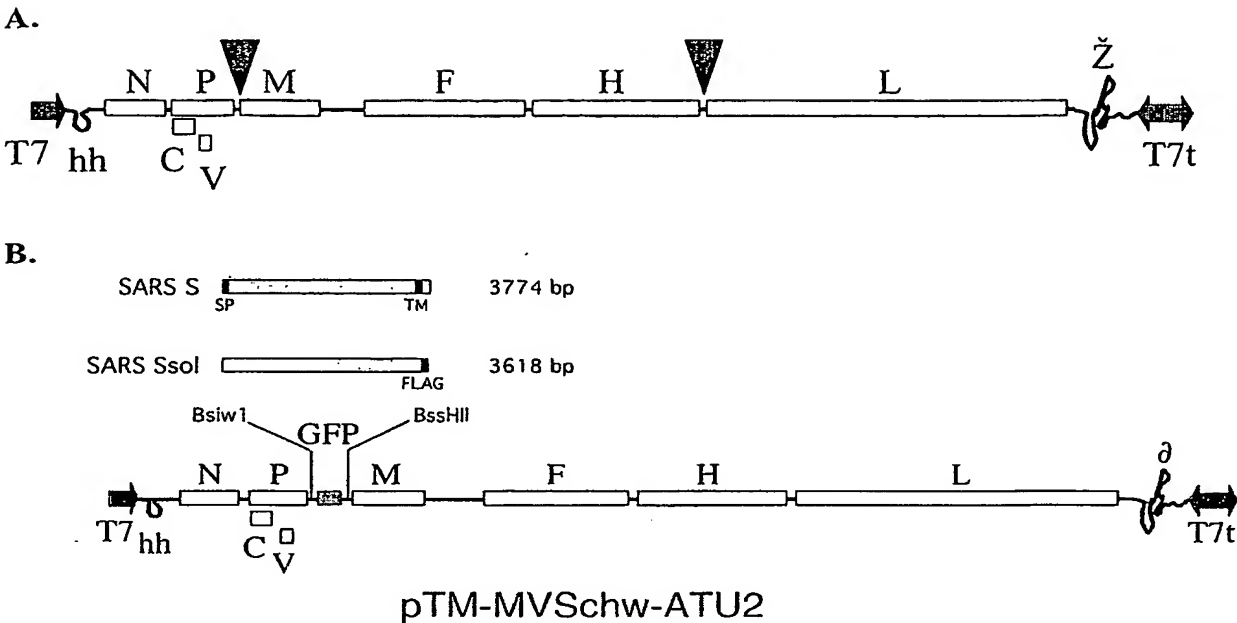


FIGURE 40

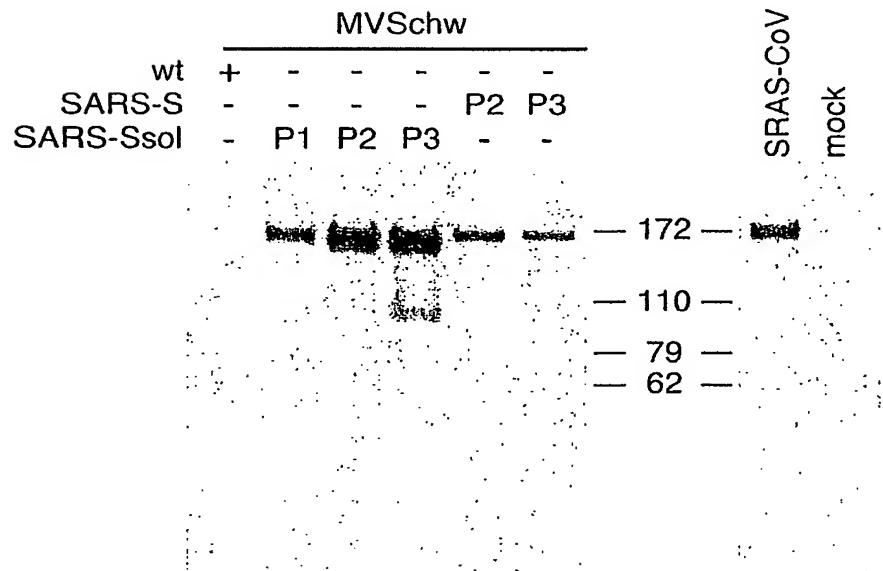


FIGURE 41



115/116

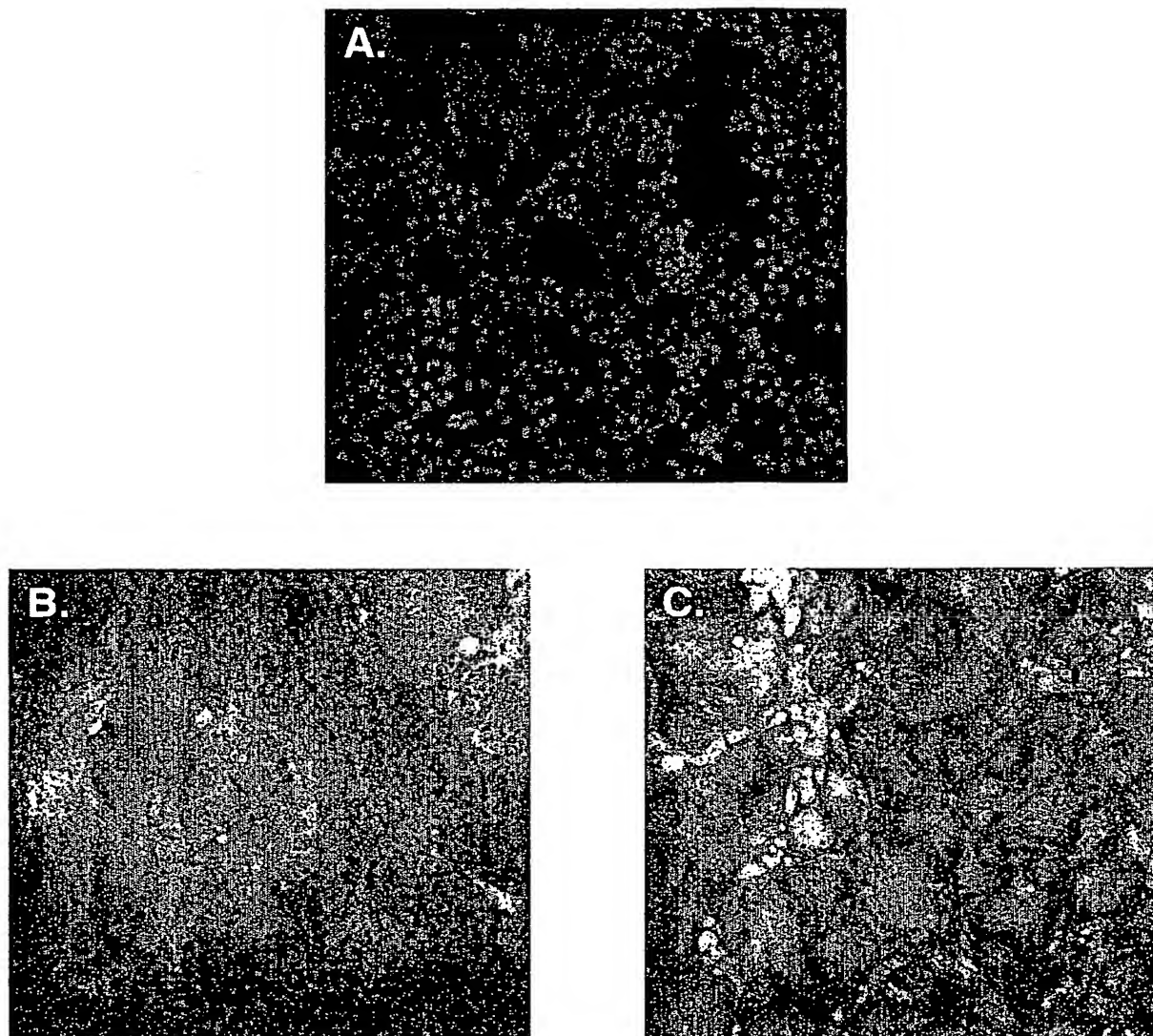


FIGURE 42

116/116

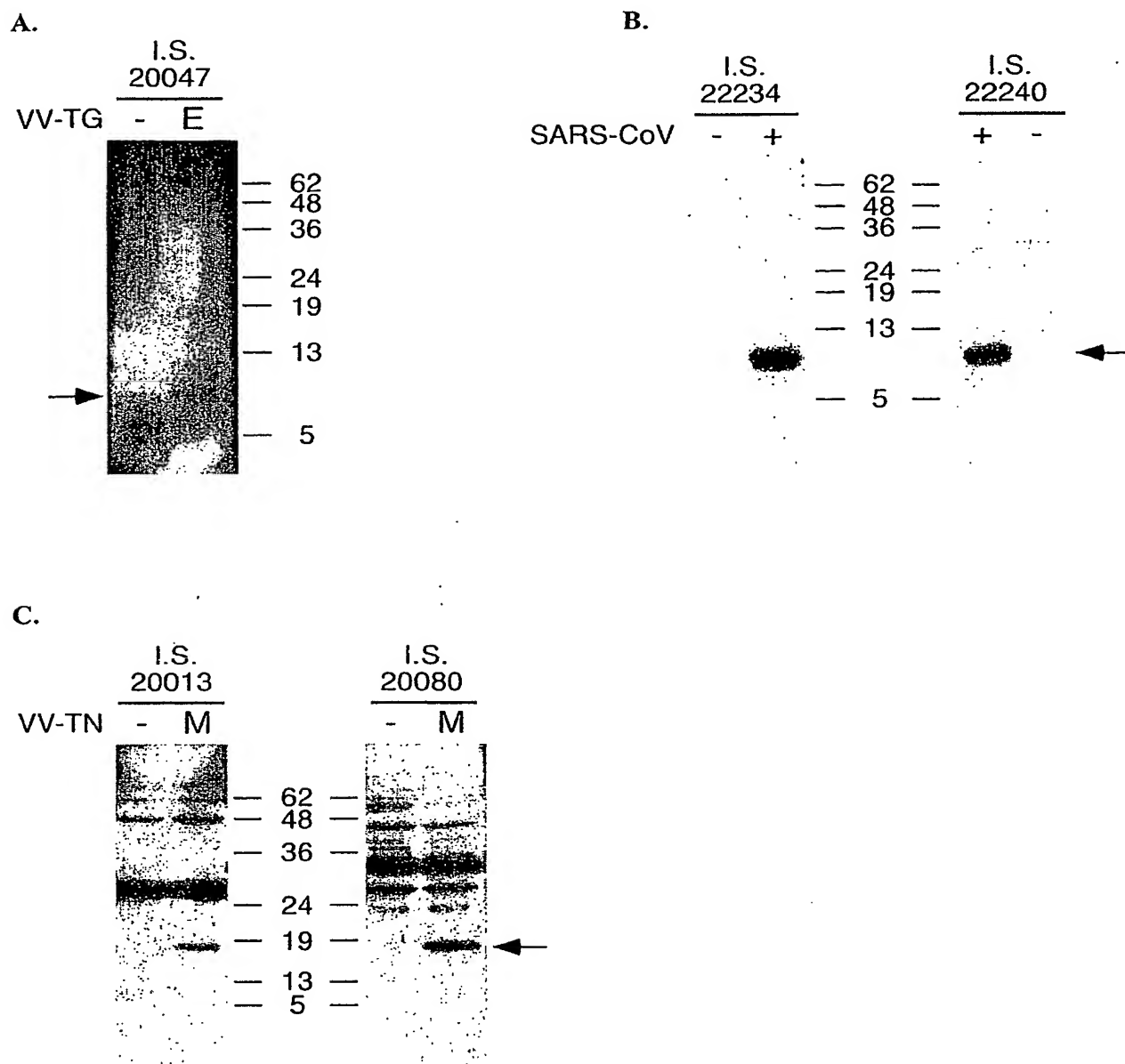


FIGURE 43

S226CAS111.ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT PASTEUR  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE PARIS 7  
VAN DER WERF, Sylvie  
ESCRIOU, Nicolas  
CRESCENZO-CHAIGNE, Bernadette  
MANUGUERRA, Jean-Claude  
KUNST, Franck  
CALLENDRET, Benoît  
BETTON, Jean-Michel  
LORIN, Valérie  
GERBAUD, Sylvie  
BURGUIERE, Ana Maria  
AZEBI, Saliha  
CHARNEAU, Pierre  
TANGY, Frédéric  
COMBREDET, Chantal  
DELAGNEAU, Jean-François  
MARTIN, Monique

<120> UTILISATION DES PROTEINES ET DES PEPTIDES CODES PAR LE GENOME D'UNE  
NOUVELLE SOUCHE DE CORONAVIRUS ASSOCIE AU SARS

<130> 226-111ext

<150> FR 0314152

<151> 2003-12-02

<150> FR 0314151

<151> 2003-12-02

<160> 158

S226CAS111.ST25

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 29746

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 1  
atattagggtt tttacctacc caggaaaagc caaccaacct cgatctcttg tagatctggt 60  
ctctaaacga acttttaaat ctgtgtagct gtcgctcggc tgcatgccta gtgcacctac 120  
gcagtataaa caataataaa ttttactgtc gttgacaaga aacgagtaac tcgtccctct 180  
tctgcagact gcttacgggt tcgtccgtgt tgcagtcgat catcagcata cctaggtttc 240  
gtccgggtgt gaccgaaagg taagatggag agccttggtc ttggtgtcaa cgagaaaaca 300  
cacgtccaac tcagtttgcc tgtccttcag gttagagacg tgctagtgcg tggcttcggg 360  
gactctgtgg aagaggccct atcggaggca cgtgaacacc tcaaaaatgg cacttggtgt 420  
ctagtagagc tggaaaaagg cgtactgccc cagcttgaac agccctatgt gttcattaaa 480  
cgttctgatg ccttaagcac caatcacggc cacaaggctg ttgagctggt tgcagaaatg 540  
gacggcattc agtacggtcg tagcgggtata aactgggag tactcgtgcc acatgtgggc 600  
gaaaccccaa ttgcataccg caatgttctt cttcgtgaaga acggtataaa gggagccggt 660  
ggtcatagct atggcatcga tctaaagtct tatgacttag gtgacgagct tggcactgat 720  
cccattgaag attatgaaca aaactggaac actaagcatg gcagtgggtgc actccgtgaa 780  
ctcactcgtg agctcaatgg aggtgcagtc actcgtatg tcgacaacaa tttctgtggc 840  
ccagatgggt accctcttga ttgcatcaaa gattttctcg cacgcgcggg caagtcaatg 900  
tgcactcttt ccgaacaact tgattacatc gagtcgaaga gaggtgtcta ctgctgccgt 960  
gaccatgagc atgaaattgc ctggttact gagcgtctg ataagagcta cgagcaccag 1020  
acacccttcg aaattaagag tgccaagaaa tttgacactt tcaaagggga atgcccaaag 1080  
tttgtgtttc ctcttaactc aaaagtcaaa gtcattcaac cacgtgttga aaagaaaaag 1140  
actgagggtt tcatggggcg tatacgtctt gtgtaccctg ttgcatctcc acaggagtgt 1200  
aacaatatgc acttgtctac cttgatgaaa tgtaatcatt gcgatgaagt ttcatggcag 1260  
acgtgcgact ttctgaaagc cacttggtgaa cattgtggca ctgaaaattt agttattgaa 1320  
ggacctacta catgtgggta cctacctact aatgctgtag tgaaaatgcc atgtcctgcc 1380  
tgtcaagacc cagagattgg acctgagcat agtgttgcag attatcaca ccactcaaac 1440  
attgaaactc gactccgcaa gggaggtagg actagatggt ttggaggctg tgtgtttgcc 1500  
tatgttggct gctataataa gcgtgcctac tgggttcctc gtgctagtgc tgatattggc 1560

S226CAS111.ST25

tcaggccata	ctggcattac	tggtgacaat	gtggagacct	tgaatgagga	tctccttgag	1620
atactgagtc	gtgaacgtgt	taacattaac	attgttggcg	atcttcattt	gaatgaagag	1680
gttgccatca	ttttggcatc	tttctctgct	tctacaagtg	cctttattga	cactataaag	1740
agtcttgatt	acaagtcttt	caaaaccatt	gttgagtcct	gcggtaacta	taaagttacc	1800
aagggaaagc	ccgtaaaagg	tgcttggaac	attggacaac	agagatcagt	tttaacacca	1860
ctgtgtggtt	ttccctcaca	ggctgctggt	gttatcagat	caatctttgc	gcgcacactt	1920
gatgcagcaa	accactcaat	tcctgatttg	caaagagcag	ctgtcaccat	acttgatggt	1980
atctctgaac	agtcattacg	tcttgctgac	gccatggttt	atacttcaga	cctgctcacc	2040
aacagtgtca	ttattatggc	atatgtaact	ggtggtcttg	tacaacagac	ttctcagtgg	2100
ttgtctaadc	ttttgggcac	tactgttgaa	aaactcaggc	ctatctttga	atggattgag	2160
gcgaaactta	gtgcaggagt	tgaatttctc	aaggatgctt	gggagattct	caaatttctc	2220
attacagggt	tttttgacat	cgtcaagggt	caaatacagg	ttgcttcaga	taacatcaag	2280
gatttgttaa	aatgcttcat	tgatgttggt	aacaaggcac	tcgaaatgtg	cattgatcaa	2340
gtcactatcg	ctggcgcaaa	gttgcgatca	ctcaacttag	gtgaagtctt	catcgctcaa	2400
agcaagggac	tttaccgtca	gtgtatacgt	ggcaaggagc	agctgcaact	actcatgcct	2460
cttaaggcac	caaaagaagt	aacctttctt	gaagggtgatt	cacatgacac	agtacttacc	2520
tctgaggagg	ttgttctcaa	gaacggtgaa	ctcgaagcac	tcgagacgcc	cgttgatagc	2580
ttcacaatg	gagctatcgt	tggcacacca	gtctgtgtaa	atggcctcat	gctcttagag	2640
attaaggaca	aagaacaata	ctgcgcattg	tctcctgggt	tactggctac	aaacaatgtc	2700
tttcgcttaa	aaggggggtg	accaattaaa	ggtgtaacct	ttggagaaga	tactgtttgg	2760
gaagttcaag	gttacaagaa	tgtgagaatc	acatttgagc	ttgatgaacg	tggtgacaaa	2820
gtgcttaatg	aaaagtgtc	tgtctacact	gttgaatccg	gtaccgaagt	tactgagttt	2880
gcatgtgttg	tagcagaggc	tggtgtgaag	actttacaac	cagtttctga	tctccttacc	2940
aacatgggta	ttgatcttga	tgagtggagt	gtagctacat	tctacttatt	tgatgatgct	3000
ggtgaagaaa	acttttcatc	acgtatgtat	tgttcctttt	accctccaga	tgaggaagaa	3060
gaggacgatg	cagagtgtga	ggaagaagaa	attgatgaaa	cctgtgaaca	tgagtacggt	3120
acagaggatg	attatcaagg	tctccctctg	gaatttggtg	cctcagctga	aacagttcga	3180
gttgaggaag	aagaagagga	agactggctg	gatgatacta	ctgagcaatc	agagattgag	3240
ccagaaccag	aacctacacc	tgaagaacca	gttaatcagt	ttactgggta	tttaaaactt	3300
actgacaatg	ttgccattaa	atgtgttgac	atcgtaagg	aggcaciaag	tgctaactct	3360
atggtgattg	taaatgtctg	taacatacac	ctgaaacatg	gtggtggtgt	agcagggtgca	3420
ctcaacaagg	caaccaatgg	tgccatgcaa	aaggagagtg	atgattacat	taagctaaat	3480
ggccctctta	cagtaggagg	gtcttggttg	ctttctggac	ataatcttgc	taagaagtgt	3540
ctgcatgttg	ttggacctaa	cctaaatgca	ggtgaggaca	tccagcttct	taaggcagca	3600

S226CAS111.ST25

tatgaaaatt	tcaattcaca	ggacatctta	cttgccacat	tggtgtcagc	aggcatat	3660
ggtgctaaac	cacttcagtc	tttacaagt	tgctgtcaga	cggttcgtac	acaggtttat	3720
attgcagtca	atgacaaagc	tctttatgag	cagggtgtca	tggattatct	tgataacctg	3780
aagcctagag	tggaagcacc	taaacaagag	gagccaccaa	acacagaaga	ttccaaaact	3840
gaggagaaat	ctgtcgtaca	gaagcctgtc	gatgtgaagc	caaaaattaa	ggcctgcatt	3900
gatgagggtta	ccacaacact	ggaagaaact	aagtttctta	ccaataagtt	actcttgttt	3960
gctgatatca	atggtaagct	ttaccatgat	tctcagaaca	tgcttagagg	tgaagatatg	4020
tctttccttg	agaaggatgc	accttacatg	gtagggtgatg	ttatcactag	tggtgatatc	4080
acttggtgtg	taataccctc	caaaaaggct	ggtggcacta	ctgagatgct	ctcaagagct	4140
ttgaagaaag	tgccagttga	tgagtatata	accacgtacc	ctggacaagg	atgtgctggt	4200
tatacacttg	aggaagctaa	gactgctctt	aagaaatgca	aatctgcatt	ttatgtacta	4260
ccttcagaag	cacctaattgc	taaggaagag	attctaggaa	ctgtatcctg	gaatttgaga	4320
gaaatgcttg	ctcatgctga	agagacaaga	aaattaatgc	ctatatgcat	ggatgttaga	4380
gccataatgg	caaccatcca	acgtaagtat	aaaggaatta	aaattcaaga	gggcatcggt	4440
gactatggtg	tccgattctt	cttttatact	agtaaagagc	ctgtagcttc	tattattacg	4500
aagctgaact	ctctaaatga	gccgcttgct	acaatgccaa	ttggttatgt	gacacatggt	4560
tttaatcttg	aagaggctgc	gcgctgtatg	cgttctctta	aagctcctgc	cgtagtgtca	4620
gtatcatcac	cagatgctgt	tactacatat	aatggatacc	tcacttcgtc	atcaaagaca	4680
tctgaggagc	actttgtaga	aacagtttct	ttggctggct	cttacagaga	ttggtcctat	4740
tcaggacagc	gtacagagtt	aggtgttgaa	tttcttaagc	gtggtgacaa	aattgtgtac	4800
cacactctgg	agagccccgt	cgagtttcat	cttgacggtg	aggttctttc	acttgacaaa	4860
ctaaagagtc	tcttatccct	gcgggagggt	aagactataa	aagtgttcac	aactgtggac	4920
aacactaatc	tccacacaca	gcttgtggat	atgtctatga	catatggaca	gcagtttggt	4980
ccaacatact	tggtatggtgc	tgatgttaca	aaaattaaac	ctcatgtaaa	tcatgagggt	5040
aagactttct	ttgtactacc	tagtgatgac	acactacgta	gtgaagcttt	cgagtactac	5100
catactcttg	atgagagttt	tcttggtagg	tacatgtctg	ctttaaacca	cacaaagaaa	5160
tggaattttc	ctcaagttgg	tggtttaact	tcaattaaat	gggctgataa	caattgttat	5220
ttgtctagt	ttttattagc	acttcaacag	cttgaagtca	aattcaatgc	accagcactt	5280
caagaggctt	attatagagc	ccgtgctggt	gatgctgcta	acttttgtgc	actcatactc	5340
gcttacagta	ataaaaactgt	tggcgagctt	ggtgatgtca	gagaaactat	gacccatctt	5400
ctacagcatg	ctaatttgga	atctgcaaag	cgagttctta	atgtgggtgtg	taaacattgt	5460
ggtcagaaaa	ctactacctt	aacgggtgta	gaagctgtga	tgtatatggg	tactctatct	5520
tatgataatc	ttaagacagg	tgtttccatt	ccatgtgtgt	gtggctcgtga	tgctacacaa	5580
tatctagtac	aacaagagtc	ttcttttggt	atgatgtctg	caccacctgc	tgagtataaa	5640

S226CAS111.ST25

ttacagcaag	gtacattctt	atgtgcgaat	gagtacactg	gtaactatca	gtgtgggtcat	5700
tacactcata	taactgctaa	ggagaccctc	tatcgtattg	acggagctca	ccttacaaag	5760
atgtcagagt	acaaaggacc	agtgactgat	gttttctaca	aggaaacatc	ttacactaca	5820
accatcaagc	ctgtgtcgtg	taaactcgat	ggagttactt	acacagagat	tgaaccaaaa	5880
ttggatgggt	attataaaaa	ggataatgct	tactatacag	agcagcctat	agaccttgta	5940
ccaactcaac	cattaccaa	tgcgagtttt	gataatttca	aactcacatg	ttctaacaca	6000
aaatttgctg	atgattttaa	tcaaatagaca	ggcttcacaa	agccagcttc	acgagagcta	6060
tctgtcacat	tcttcccaga	cttgaatggc	gatgtagtgg	ctattgacta	tagacactat	6120
tcagcgagtt	tcaagaaagg	tgctaaatta	ctgcataagc	caattgtttg	gcacattaac	6180
caggctacaa	ccaagacaac	gttcaaacca	aacacttggt	gtttacgttg	tctttggagt	6240
acaaagccag	tagatacttc	aaattcattt	gaagttctgg	cagtagaaga	cacacaagga	6300
atggacaatc	ttgcttgtga	aagtcaacaa	cccacctctg	aagaagtagt	ggaaaatcct	6360
accatacaga	aggaagtcac	agagtgtgac	gtgaaaacta	ccgaagtgtg	aggcaatgtc	6420
atacttaaac	catcagatga	aggtgttaaa	gtaacacaag	agttaggtca	tgaggatcct	6480
atggctgctt	atgtggaaaa	cacaagcatt	accattaaga	aacctaata	gctttcacta	6540
gccttaggtt	taaaaacaat	tgccactcat	ggatttgctg	caattaatag	tgttccttgg	6600
agtaaaat	ttgcttatgt	caaaccattc	ttaggacaag	cagcaattac	aacatcaaat	6660
tgcgctaaga	gattagcaca	acgtgtgttt	aacaattata	tgcccttatgt	gtttacatta	6720
ttgttccaat	tgtgtacttt	tactaaaagt	accaattcta	gaattagagc	ttcactacct	6780
acaactattg	ctaaaaatag	tgtaagagat	gttgctaaat	tatgtttgga	tgccggcatt	6840
aattatgtga	agtcacccaa	atcttctaaa	ttgttcacaa	tcgctatgtg	gctattgttg	6900
ttaagtat	gcttaggttc	tctaactctgt	gtaactgctg	cttttggtgt	actcttatct	6960
aattttggtg	ctccttctta	ttgtaatggc	gttagagaat	tgtatcttaa	ttcgtctaac	7020
gttactacta	tggtttctg	tgaaggttct	tttccttgca	gcatttgttt	aagtggatta	7080
gactcccttg	attcttatcc	agctcttgaa	accattcagg	tgacgatttc	atcgtacaag	7140
ctagacttga	caattttagg	tctggccgct	gagtgggttt	tgccatatat	gttgttcaca	7200
aaattctttt	atttattagg	tctttcagct	ataatgcagg	tggtcttttg	ctattttgct	7260
agtcatttca	tcagcaattc	ttggctcatg	tggtttatca	ttagtattgt	acaaatggca	7320
cccgtttctg	caatgggttag	gatgtacatc	ttctttgctt	ctttctacta	catatggaag	7380
agctatgttc	atatcatgga	tggttgcacc	tcttcgactt	gcatgatgtg	ctataagcgc	7440
aatcgtgcc	cacgcgttga	gtgtacaact	attgttaatg	gcatgaagag	atctttctat	7500
gtctatgcaa	atggaggccg	tggttctctg	aagactcaca	attggaattg	tctcaattgt	7560
gacacatttt	gactggtag	tacattcatt	agtgatgaag	ttgctcgtga	tttgtcactc	7620
cagtttaaaa	gaccaatcaa	ccctactgac	cagtcacgt	atattgttga	tagtggttgc	7680

S226CAS111.ST25

gtgaaaaatg	gcgcgcttca	cctctacttt	gacaaggctg	gtcaaaagac	ctatgagaga	7740
catccgctct	cccattttgt	caatttagac	aatttgagag	ctaacaacac	taaaggttca	7800
ctgcctatta	atgtcatagt	ttttgatggc	aagtccaaat	gcgacgagtc	tgcttctaag	7860
tctgcttctg	tgtactacag	tcagctgatg	tgccaaccta	ttctgttgct	tgaccaagct	7920
cttgatatcag	acgttggaga	tagtactgaa	gtttccgtta	agatgtttga	tgcttatgtc	7980
gacacctttt	cagcaacttt	tagtgttcct	atggaaaaac	ttaaggcact	tgttgctaca	8040
gctcacagcg	agttagcaaa	gggtgtagct	ttagatggtg	tcctttctac	attcgtgtca	8100
gctgcccgcg	aagggtgttg	tgataccgat	gttgacacaa	aggatgttat	tgaatgtctc	8160
aaactttcac	atcactctga	cttagaagtg	acaggtgaca	gttgtaacaa	tttcatgctc	8220
acctataata	aggttgaaaa	catgacgccc	agagatcttg	gcgcatgtat	tgactgtaat	8280
gcaaggcata	tcaatgccc	agtagcaaaa	agtcacaatg	tttcactcat	ctggaatgta	8340
aaagactaca	tgtctttatc	tgaacagctg	cgtaaacaaa	ttcgtagtgc	tgccaagaag	8400
aacaacatac	cttttagact	aacttggtgct	acaactagac	aggttggtcaa	tgctataact	8460
actaaaatct	cactcaaggg	tggttaagatt	gttagtactt	gttttaaact	tatgcttaag	8520
gccacattat	tgtgcgttct	tgctgcattg	gtttgttata	tcgttatgcc	agtacataca	8580
ttgtcaatcc	atgatgggta	cacaaatgaa	atcattgggt	acaaagccat	tcaggatggg	8640
gtcactcgtg	acatcatttc	tactgatgat	tgttttgcaa	ataaacatgc	tggttttgac	8700
gcatggttta	gccagcgtag	tggttcatac	aaaaatgaca	aaagctgccc	tgtagtagct	8760
gctatcatta	caagagagat	tggtttcata	gtgcctggct	taccgggtac	tgtgctgaga	8820
gcaatcaatg	gtgacttctt	gcattttcta	cctcgtgttt	ttagtgctgt	tggcaacatt	8880
tgctacacac	cttccaaact	cattgagtat	agtgattttg	ctacctctgc	ttgcgttctt	8940
gctgctgagt	gtacaatttt	taaggatgct	atgggcaaac	ctgtgccata	ttgttatgac	9000
actaatttgc	tagaggggtt	tatttcttat	agtgagcttc	gtccagacac	tcgttatgtg	9060
cttatggatg	gttccatcat	acagtttcct	aacacttacc	tggaggggtt	tgtagagta	9120
gtaacaactt	ttgatgctga	gtactgtaga	catggtacat	gcgaaagggtc	agaagtaggt	9180
atttgcctat	ctaccagtgg	tagatgggtt	cttaataatg	agcattacag	agctctatca	9240
ggagttttct	gtggtgttga	tgcgatgaat	ctcatagcta	acatctttac	tcctcttggtg	9300
caacctgtgg	gtgctttaga	tgtgtctgct	tcagtagtggt	ctggtgggtat	tattgccata	9360
ttggtgactt	gtgctgccta	ctactttatg	aaattcagac	gtgtttttgg	tgagtacaac	9420
catgttggtg	ctgctaatac	acttttggtt	ttgatgtctt	tcactatact	ctgtctggta	9480
ccagcttaca	gctttctgcc	gggagtctac	tcagtctttt	acttgtactt	gacattctat	9540
ttcaccaatg	atgtttcatt	cttggctcac	cttcaatggg	ttgccatggt	ttctcctatt	9600
gtgccttttt	ggataacagc	aatctatgta	ttctgtatgt	ctctgaagca	ctgccattgg	9660
ttctttaaca	actatcttag	gaaaagagtc	atgtttaatg	gagttacatt	tagtaccttc	9720



S226CAS111.ST25

gaggaggctg	ctttgtgtac	ctttttgctc	aacaaggaaa	tgtacctaaa	attgcgtagc	9780
gagacactgt	tgccacttac	acagtataac	aggtatcttg	ctctatataa	caagtacaag	9840
tatttcagtg	gagccttaga	tactaccagc	tatcgtgaag	cagcttgctg	ccacttagca	9900
aaggctctaa	atgacttttag	caactcaggt	gctgatgttc	tctaccaacc	accacagaca	9960
tcaatcactt	ctgctgttct	gcagagtggg	tttaggaaaa	tggcattccc	gtcaggcaaa	10020
gttgaagggt	gcatgggtaca	agtaacctgt	ggaactacaa	ctcttaatgg	attgtgggtg	10080
gatgacacag	tatactgtcc	aagacatgtc	atgtgcacag	cagaagacat	gcttaatcct	10140
aactatgaag	atctgctcat	tcgcaaatcc	aaccatagct	ttcttggtca	ggctggcaat	10200
gttcaacttc	gtgtttattg	ccattctatg	caaaattgtc	tgcttaggct	taaagttgat	10260
acttctaacc	ctaagacacc	caagtataaa	tttgtccgta	tccaacctgg	tcaaacattt	10320
tcagttctag	catgctacaa	tggttcacca	tctgggtgtt	atcagtgtgc	catgagacct	10380
aatcatacca	ttaaagggtc	tttccttaat	ggatcatgtg	gtagtggttg	ttttaacatt	10440
gattatgatt	gcgtgtcttt	ctgctatatg	catcatatgg	agcttccaac	aggagtacac	10500
gctgggtactg	acttagaagg	taaattctat	gggccatttg	ttgacagaca	aactgcacag	10560
gctgcaggta	cagacacaac	cataacatta	aatgttttgg	catggctgta	tgctgctggt	10620
atcaatgggtg	atagggtggt	tcttaataga	ttcaccacta	ctttgaatga	ctttaacctt	10680
gtggcaatga	agtacaacta	tgaacctttg	acacaagatc	atgttgacat	attgggacct	10740
ctttctgctc	aaacaggaat	tgccgtctta	gatatgtgtg	ctgctttgaa	agagctgctg	10800
cagaatggta	tgaatggtcg	tactatcctt	ggtagcacta	ttttagaaga	tgagtttaca	10860
ccatttgatg	ttgttagaca	atgctctggg	gttaccttcc	aaggtaagtt	caagaaaatt	10920
gttaagggca	ctcatcattg	gatgctttta	actttcttga	catcactatt	gattcttggt	10980
caaagtacac	agtggctact	gtttttcttt	gtttacgaga	atgctttctt	gccattttact	11040
cttggtatta	tggcaattgc	tgcatgtgct	atgctgcttg	ttaagcataa	gcacgcattc	11100
ttgtgcttgt	ttctgttacc	ttctcttgca	acagttgctt	actttaatat	ggctctacatg	11160
cctgctagct	gggtgatgcg	tatcatgaca	tggcttgaat	tggctgacac	tagcttgtct	11220
ggttataggc	ttaaggattg	tgttatgtat	gcttcagctt	tagttttgct	tattctcatg	11280
acagctcgca	ctgtttatga	tgatgctgct	agacgtgttt	ggacactgat	gaatgtcatt	11340
acacttgttt	acaaagtcta	ctatggtaat	gctttagatc	aagctatttc	catgtgggcc	11400
ttagttattt	ctgtaacctc	taactattct	gggtgcgtta	cgactatcat	gttttttagct	11460
agagctatag	tgtttgtgtg	tgttgagtat	taccattgtt	tatttattac	tggcaacacc	11520
ttacagtgtg	tcatgcttgt	ttattgtttc	ttaggctatt	gttgctgctg	ctactttggc	11580
cttttctggt	tactcaaccg	ttacttcagg	cttactcttg	gtgtttatga	ctacttggtc	11640
tctacacaag	aatttaggta	tatgaactcc	caggggcttt	tgccctcctaa	gagtagtatt	11700
gatgctttca	agcttaacat	taagttgttg	ggatttggag	gtaaaccatg	tatcaagggt	11760

S226CAS111.ST25

gctactgtac	agtctaaaat	gtctgacgta	aagtgacacat	ctgtggtact	gctctcggtt	11820
cttcaacaac	ttagagtaga	gtcatcttct	aaattgtggg	cacaatgtgt	acaactccac	11880
aatgatattc	ttcttgcaaa	agacacaact	gaagctttcg	agaagatggt	ttctcttttg	11940
tctgttttgc	tatccatgca	gggtgctgta	gacattaata	ggttgtgcga	ggaaatgctc	12000
gataaccgtg	ctactcttca	ggctattgct	tcagaattta	gttctttacc	atcatatgcc	12060
gcttatgcca	ctgcccagga	ggcctatgag	caggctgtag	ctaattggtga	ttctgaagtc	12120
gttctcaaaa	agttaaagaa	atctttgaaat	gtggctaaat	ctgagtttga	ccgtgatgct	12180
gccatgcaac	gcaagttgga	aaagatggca	gatcaggcta	tgacccaaat	gtacaaacag	12240
gcaagatctg	aggacaagag	ggcaaaagta	actagtgcga	tgcaaacaat	gctcttcact	12300
atgcttagga	agcttgataa	tgatgcactt	aacaacatta	tcaacaatgc	gcgtgatggt	12360
tgtgttccac	tcaacatcat	accattgact	acagcagcca	aactcatggt	tgttgtccct	12420
gattatggta	cctacaagaa	cacttgtgat	ggtaacacct	ttacatatgc	atctgcactc	12480
tgggaaatcc	agcaagttgt	tgatgcggat	agcaagattg	ttcaacttag	tgaaattaac	12540
atggacaatt	caccaaattt	ggcttggcct	cttattgtta	cagctctaag	agccaactca	12600
gctgttaaac	tacagaataa	tgaactgagt	ccagtagcac	tacgacagat	gtcctgtgcg	12660
gctggtacca	cacaaacagc	ttgtactgat	gacaatgcac	ttgcctacta	taacaattcg	12720
aagggaggta	ggtttgtgct	ggcattacta	tcagaccacc	aagatctcaa	atgggctaga	12780
ttccctaaga	gtgatggtac	aggtacaatt	tacacagaac	tggaaccacc	ttgtaggttt	12840
gttacagaca	caccaaagag	gcctaaagtg	aaatacttgt	acttcatcaa	aggcttaaac	12900
aacctaataa	gaggtatggt	gctgggcagt	ttagctgcta	cagtacgtct	tcaggctgga	12960
aatgctacag	aagtacctgc	caattcaact	gtgctttcct	tctgtgcttt	tgcagtagac	13020
cctgctaaag	catataagga	ttacctagca	agtggaggac	aaccaatcac	caactgtgtg	13080
aagatgttgt	gtacacacac	tggtacagga	caggcaatta	ctgtaacacc	agaagctaac	13140
atggaccaag	agtccttttg	tgggtgcttca	tgttgtctgt	attgtagatg	ccacattgac	13200
catccaaatc	ctaaaggatt	ctgtgacttg	aaaggtaagt	acgtccaaat	acctaccact	13260
tgtgctaattg	accagtggtg	ttttacactt	agaaacacag	tctgtaccgt	ctgcggaatg	13320
tggaaagggt	atggctgtag	ttgtgaccaa	ctccgcgaac	ccttgatgca	gtctgcggat	13380
gcatcaacgt	ttttaaacgg	gtttgcggtg	taagtgcagc	ccgtcttaca	ccgtgcggca	13440
caggcactag	tactgatgtc	gtctacaggg	cttttgatat	ttacaacgaa	aaagttgctg	13500
gttttgcaaa	gttcctaaaa	actaattgct	gtcgcttcca	ggagaaggat	gaggaaggca	13560
atttattaga	ctcttacttt	gtagttaaga	ggcatactat	gtctaactac	caacatgaag	13620
agactattta	taacttggtt	aaagattgtc	cagcggttgc	tgtccatgac	tttttcaagt	13680
ttagagtaga	tgggtgacatg	gtaccacata	tatcacgtca	gcgtctaact	aaatacacaa	13740
tggctgattt	agtctatgct	ctacgtcatt	ttgatgaggg	taattgtgat	acattaaaag	13800

S226CAS111.ST25

```

aaataactcgt cacatacaat tgctgtgatg atgattatatt caataagaag gattggtatg 13860
acttcgtaga gaatcctgac atcttacgcg tatatgctaa cttagggtgag cgtgtacgcc 13920
aatcattatt aaagactgta caattctgcg atgctatgcg tgatgcaggc attgtaggcg 13980
tactgacatt agataatcag gatcttaatg ggaactggta cgatttcggt gatttcgtac 14040
aagtagcacc aggctgcgga gticcatttg tggattcata ttactcattg ctgatgccca 14100
tcctcacttt gactagggca ttggctgctg agtcccatat ggatgctgat ctcgcaaac 14160
cacttattaa gtgggatttg ctgaaatatg attttacgga agagagactt tgtctcttcg 14220
accgttattt taaatattgg gaccagacat accatcccaa ttgtattaac tgtttggatg 14280
atagggtgat ctttcattgt gcaaacttta atgtgttatt ttctactgtg tttccaccta 14340
caagttttgg accactagta agaaaaatat ttgtagatgg tgttcctttt gttgtttcaa 14400
ctggatacca ttttcgtgag ttaggagtcg tacataatca ggatgtaaac ttacatagct 14460
cgcgctctcag tttcaaggaa ctttttagtgt atgctgctga tccagctatg catgcagctt 14520
ctggcaattt attgctagat aaacgcacta catgcttttc agtagctgca ctaacaaaca 14580
atgttgcttt tcaaactgtc aaaccggta attttaataa agacttttat gactttgctg 14640
tgtctaaagg tttctttaag gaaggaagtt ctgttgaact aaaacacttc ttctttgctc 14700
aggatggcaa cgctgctatc agtgattatg actattatcg ttataatctg ccaacaatgt 14760
gtgatatcag acaactccta ttcgtagttg aagttgttga taaatacttt gattgttacg 14820
atgggtggctg tattaatgcc aaccaagtaa tcgttaacaa tctggataaa tcagctggtt 14880
tcccatttaa taaatggggg aaggctagac tttattatga ctcaatgagt tatgaggatc 14940
aagatgcact tttcgctgat actaagcgta atgtcatccc tactataact caaatgaatc 15000
ttaagtatgc cattagtgc aagaatagag ctcgcaccgt agctggtgtc tctatctgta 15060
gtactatgac aaatagacag tttcatcaga aattattgaa gtcaatagcc gccactagag 15120
gagctactgt ggtaattgga acaagcaagt tttacgggtg ctggcataat atgttaaaaa 15180
ctgtttacag tgatgtagaa actccacacc ttatgggttg ggattatcca aaatgtgaca 15240
gagccatgcc taacatgctt aggataatgg cctctcttgt tcttgctcgc aaacataaca 15300
cttgctgtaa cttatcacac cgtttctaca ggtagctaa cgagtgtgcg caagtattaa 15360
gtgagatggg catgtgtggc ggctcactat atgttaaacc aggtggaaca tcatccggtg 15420
atgctacaac tgcttatgct aatagtgtct ttaacatttg tcaagctgtt acagccaatg 15480
taaatgcact tctttcaact gatggtaata agatagctga caagtatgtc cgcaatctac 15540
aacacaggct ctatgagtgt ctctatagaa atagggatgt tgatcatgaa ttcgtggatg 15600
agttttacgc ttacctgcgt aaacatttct ccatgatgat tctttctgat gatgccgttg 15660
tgtgctataa cagtaactat gcggctcaag gtttagtagc tagcattaag aactttaagg 15720
cagttcttta ttatcaaat aatgtgttca tgtctgaggc aaaatgttgg actgagactg 15780
accttactaa aggacctcac gaattttgct cacagcatat aatgctagtt aaacaaggag 15840

```

S226CAS111.ST25

atgattacgt	gtacctgcct	taccagatc	catcaagaat	attaggcgca	ggctgttttg	15900
tcgatgatat	tgtcaaaaca	gatggtacac	ttatgattga	aagggttcgtg	tactgggcta	15960
ttgatgctta	cccacttaca	aaacatccta	atcaggagta	tgctgatgtc	tttactttgt	16020
atttacaata	cattagaaag	ttacatgatg	agcttactgg	ccacatgttg	gacatgtatt	16080
ccgtaatgct	aactaatgat	aacacctcac	ggtactggga	acctgagttt	tatgaggcta	16140
tgtacacacc	acatacagtc	ttgcaggctg	taggtgcttg	tgtattgtgc	aattcacaga	16200
cttcacttcg	ttgcggtgcc	tgtattagga	gaccattcct	atgttgcaag	tgctgctatg	16260
accatgtcat	ttcaacatca	cacaaattag	tgttgctctgt	taatccctat	gtttgcaatg	16320
ccccaggttg	tgatgtcact	gatgtgacac	aactgtatct	aggaggatatg	agctattatt	16380
gcaagtcaca	taagcctccc	attagttttc	cattatgtgc	taatggtcag	gtttttgggt	16440
tatacaaaaa	cacatgtgta	ggcagtgaca	atgtcactga	cttcaatgcg	atagcaacat	16500
gtgattggac	taatgctggc	gattacatac	ttgccaacac	ttgtactgag	agactcaagc	16560
ttttcgcagc	agaaacgctc	aaagccactg	aggaaacatt	taagctgtca	tatgggtattg	16620
ccactgtacg	cgaagtactc	tctgacagag	aattgcatct	ttcatgggag	gttggaanaac	16680
ctagaccacc	attgaacaga	aactatgtct	ttactgggta	ccgtgtaact	aaaaatagta	16740
aagtacagat	tggagagtac	acctttgaaa	aagggtgacta	tgggtgatgct	gttggtgtaca	16800
gaggtactac	gacatacaag	ttgaatgttg	gtgattactt	tgtgttgaca	tctcactctg	16860
taatgccact	tagtgcacct	actctagtgc	cacaagagca	ctatgtgaga	attactggct	16920
tgtacccaac	actcaacatc	tcagatgagt	tttctagcaa	tgttgcaaata	tatcaaaaagg	16980
tcggcatgca	aaagtactct	acactccaag	gaccacctgg	tactgggtaag	agtcatttttg	17040
ccatcggact	tgctctctat	taccatcttg	ctcgcatagt	gtatacggca	tgctctcatg	17100
cagctgttga	tgccctatgt	gaaaaggcat	taaaatattt	gcccatagat	aaatgtagta	17160
gaatcatacc	tgcgcggtgcg	cgcgtagagt	gttttgataa	attcaaagtg	aattcaacac	17220
tagaacagta	tgttttctgc	actgtaaatg	cattgccaga	aacaactgct	gacattgtag	17280
tctttgatga	aatctctatg	gctactaatt	atgacttgag	tgttgtaaat	gctagacttc	17340
gtgcaaaaaca	ctacgtctat	attggcgatc	ctgctcaatt	accagcccc	cgcacattgc	17400
tgactaaagg	cactagaa	ccagaatatt	ttaattcagt	gtgcagactt	atgaaaacaa	17460
taggtccaga	catgttcctt	ggaacttgct	gccgttggtcc	tgctgaaatt	gttgacactg	17520
tgagtgtctt	agtttatgac	aataagctaa	aagcacacaa	ggataagtca	gctcaatgct	17580
tcaaaatgtt	ctacaaagg	gttattacac	atgatgtttc	atctgcaatc	aacagacctc	17640
aaataggcgt	tgtaagagaa	tttcttacac	gcaatcctgc	ttggagaaaa	gctgttttta	17700
tctcacctta	taattcacag	aacgctgtag	cttcaaaaat	cttaggattg	cctacgcaga	17760
ctgttgattc	atcacagggt	tctgaatatg	actatgtcat	attcacacaa	actactgaaa	17820
cagcacactc	ttgtaatgtc	aaccgcttca	atgtggctat	cacaagggca	aaaattggca	17880

S226CAS111.ST25

ttttgtgcat	aatgtctgat	agagatcttt	atgacaaaact	gcaatttaca	agtctagaaa	17940
taccacgtcg	caatgtggct	acattacaag	cagaaaaatgt	aactggactt	tttaaggact	18000
gtagtaagat	cattactggg	cttcataccta	cacaggcacc	tacacacctc	agcgttgata	18060
taaagttcaa	gactgaagga	ttatgtgttg	acataccagg	cataccaaag	gacatgacct	18120
accgtagact	catctctatg	atgggtttca	aaatgaatta	ccaagtcaat	ggttacccta	18180
atatgtttat	cacccgcgaa	gaagctattc	gtcacgttcg	tgcgtggatt	ggctttgatg	18240
tagagggtcg	tcatgcaact	agagatgctg	tgggtactaa	cctacctctc	cagctaggat	18300
tttctacagg	tgtaactta	gtagctgtac	cgactgggta	tggtgacact	gaaaataaca	18360
cagaattcac	cagagttaat	gcaaaacctc	caccagggtga	ccagttttaa	catctttatac	18420
cactcatgta	taaaggcttg	ccctggaatg	tagtgcgat	taagatagta	caaatgctca	18480
gtgatacact	gaaaggattg	tcagacagag	tcgtgttcgt	cctttgggcg	catggctttg	18540
agcttacatc	aatgaagtac	tttgtcaaga	ttggacctga	aagaacgtgt	tgtctgtgtg	18600
acaaacgtgc	aacttgcttt	tctacttcat	cagatactta	tgcttgctgg	aatcattctg	18660
tgggttttga	ctatgtctat	aaccatttta	tgattgatgt	tcagcagtgg	ggctttacgg	18720
gtaaccttca	gagtaaccat	gaccaacatt	gccagggtaca	tggaaatgca	catgtggcta	18780
gttgtgatgc	tatcatgact	agatgtttag	cagtccatga	gtgctttgtt	aagcgcgttg	18840
attggtctgt	tgaataccct	attataggag	atgaactgag	ggttaattct	gcttgcagaa	18900
aagtacaaca	catggttgtg	aagtctgcat	tgcttgctga	taagtttcca	gttcttcatg	18960
acattggaaa	tccaaaggct	atcaagtgtg	tgcttcaggc	tgaagtagaa	tggaagttct	19020
acgatgctca	gccatgtagt	gacaaagctt	acaaaataga	ggaactcttc	tattcttatg	19080
ctacacatca	cgataaattc	actgatgggtg	tttgtttgtt	ttggaattgt	aacgttgatc	19140
gttaccagc	caatgcaatt	gtgtgtagggt	ttgacacaag	agtcttgtca	aacttgaact	19200
taccaggctg	tgatgggtgg	agtttgtatg	tgaataagca	tgcatccac	actccagctt	19260
tcgataaaag	tgcatttact	aatttaaagc	aattgccttt	cttttactat	tctgatagtc	19320
cttgtgagtc	tcatggcaaa	caagtagtgt	cggatattga	ttatgttcca	ctcaaactctg	19380
ctacgtgtat	tacacgatgc	aatttaggtg	gtgctgtttg	cagacaccat	gcaaatgagt	19440
accgacagta	cttgggatgca	tataatatga	tgatttctgc	tggatttagc	ctatggattt	19500
acaaacaatt	tgatacttat	aacctgtgga	atacatttac	caggttacag	agtttagaaa	19560
atgtggctta	taatgttgtt	aataaaggac	actttgatgg	acacgccggc	gaagcacctg	19620
tttccatcat	taataatgct	gtttacacaa	aggtagatgg	tattgatgtg	gagatctttg	19680
aaaataagac	aacacttcct	gttaatgttg	catttgagct	ttgggctaag	cgtaacatta	19740
aaccagtgcc	agagattaag	atactcaata	atttggtgtg	tgatatcgct	gctaatactg	19800
taatctggga	ctacaaaaga	gaagccccag	cacatgtatc	tacaataggt	gtctgcacaa	19860
tgactgacat	tgccaagaaa	cctactgaga	gtgcttgctc	ttcacttact	gtcttggttg	19920

S226CAS111.ST25

atggttagagt	ggaaggacag	gtagaccttt	ttagaaacgc	ccgtaatggt	gttttaataa	19980
cagaagggttc	agtcaaaggt	ctaacacctt	caaagggacc	agcacaagct	agcgtcaatg	20040
gagtcacatt	aattggagaa	tcagtaaaaa	cacagtttaa	ctactttaag	aaagtagacg	20100
gcattattca	acagttgcct	gaaacctact	ttactcagag	cagagactta	gaggattttta	20160
agcccagatc	acaaatggaa	actgactttc	tcgagctcgc	tatggatgaa	ttcatacagc	20220
gatataagct	cgagggtctat	gccttcgaac	acatcgttta	tggagatttc	agtcattggac	20280
aacttggcgg	tcttcattta	atgataggct	tagccaagcg	ctcacaagat	tcaccactta	20340
aattagagga	ttttatccct	atggacagca	cagtgaaaaa	ttacttcata	acagatgcgc	20400
aaacagggttc	atcaaaatgt	gtgtgttctg	tgattgatct	tttacttgat	gactttgtcg	20460
agataataaa	gtcacaagat	ttgtcagtga	tttcaaaagt	gggtcaagggt	acaattgact	20520
atgctgaaat	ttcattcatg	ctttggtgta	aggatggaca	tggtgaaacc	ttctacccaa	20580
aactacaagc	aagtcaagcg	tggcaaccag	gtgttgcgat	gcctaacttg	tacaagatgc	20640
aaagaatgct	tcttgaaaag	tgtgaccttc	agaattatgg	tgaaaatgct	gttataccaa	20700
aaggaataat	gatgaatgtc	gcaaagtata	ctcaactgtg	tcaatactta	aatacactta	20760
cttttagctgt	accctacaac	atgagagtta	ttcactttgg	tgctggctct	gataaaggag	20820
ttgcaccagg	tacagctgtg	ctcagacaat	ggttgccaac	tggcacacta	cttgtcgatt	20880
cagatcttaa	tgacttcgtc	tccgacgcag	attctacttt	aattggagac	tgtgcaacag	20940
tacatacggc	taataaatgg	gaccttatta	ttagcgatat	gtatgaccct	aggaccaaac	21000
atgtgacaaa	agagaatgac	tctaaagaag	ggtttttcac	ttatctgtgt	ggatttataa	21060
agcaaaaact	agccctgggt	ggttctatag	ctgtaaagat	aacagagcat	tcttggaatg	21120
ctgaccttta	caagcttatg	ggccatttct	catggtggac	agcttttggt	acaaatgtaa	21180
atgcatcatc	atcggaagca	tttttaattg	gggctaacta	tcttggcaag	ccgaaggaac	21240
aaattgatgg	ctataccatg	catgctaact	acattttctg	gaggaacaca	aatcctatcc	21300
agttgtcttc	ctattcactc	tttgacatga	gcaaatttcc	tcttaaatta	agaggaactg	21360
ctgtaatgtc	tcttaaggag	aatcaaatca	atgatatgat	ttattctctt	ctggaaaaag	21420
gtaggcttat	cattagagaa	aacaacagag	ttgtggtttc	aagtgatatt	cttggttaaca	21480
actaaacgaa	catgtttatt	ttcttattat	ttcttactct	cactagtgggt	agtgaccttg	21540
accggtgcac	cacttttgat	gatgttcaag	ctcctaatta	cactcaacat	acttcatcta	21600
tgaggggggt	ttactatcct	gatgaaattt	ttagatcaga	cactctttat	ttactcagg	21660
atttattttct	tccattttat	tctaattgta	cagggtttca	tactattaat	catacgtttg	21720
gcaaccctgt	catacctttt	aaggatggta	tttattttgc	tgccacagag	aaatcaaagt	21780
ttgtccgtgg	ttgggttttt	ggttctacca	tgaacaacaa	gtcacagtcg	gtgattatta	21840
ttaacaattc	tactaatgtt	gttatacgag	catgtaactt	tgaattgtgt	gacaaccctt	21900
tctttgctgt	ttctaaaccc	atgggtacac	agacacatac	tatgatattc	gataatgcat	21960

S226CAS111.ST25

ttaattgcac	tttcgagtac	atatctgatg	ccttttcgct	tgatgtttca	gaaaagtcag	22020
gtaattttta	acacttacga	gagtttgtgt	ttaaaaataa	agatgggttt	ctctatgttt	22080
ataagggcta	tcaacctata	gatgtagttc	gtgatctacc	ttctgggttt	aacactttga	22140
aacctatfff	taagttgcct	cttggtatta	acattacaaa	ttttagagcc	attcttacag	22200
ccttttcacc	tgctcaagac	atttggggca	cgtcagctgc	agcctatfff	gttggctatt	22260
taaagccaac	tacatttatg	ctcaagtatg	atgaaaatgg	tacaatcaca	gatgctgttg	22320
attgttctca	aaatccactt	gctgaactca	aatgctctgt	taagagcttt	gagattgaca	22380
aagggaattta	ccagacctct	aatttcaggg	ttgttccctc	aggagatggt	gtgagattcc	22440
ctaataattac	aaacttgtgt	ccttttggag	aggtttttta	tgctactaaa	ttcccttctg	22500
tctatgcatg	ggagagaaaa	aaaatttcta	atttgtgttg	tgattactct	gtgctctaca	22560
actcaacatt	tttttcaacc	tttaagtgtc	atggcggttc	tgccactaag	ttgaatgatc	22620
tttgcttctc	caatgtctat	gcagattcct	ttgtagtcaa	gggagatgat	gtaagacaaa	22680
tagcgccagg	acaaactggg	gttattgctg	attataatta	taaattgcca	gatgatttca	22740
tggttgtgtg	ccttgcttgg	aatactagga	acattgatgc	tacttcaact	ggtaattata	22800
attataaata	taggtatcct	agacatggca	agcttaggcc	ctttgagaga	gacatatcta	22860
atgtgccttt	ctcccctgat	ggcaaaccct	gcacccacc	tgctcttaat	tgttattggc	22920
cattaaatga	ttatggtttt	tacaccacta	ctggcattgg	ctaccaacct	tacagagttg	22980
tagtactttc	ttttgaactt	ttaaattgcac	cggccacggg	ttgtggacca	aaattatcca	23040
ctgaccttat	taagaaccag	tgtgtcaatt	ttaattttta	tggactcact	ggtactggtg	23100
tgttactcc	ttcttcaaag	agatttcaac	catttcaaca	atttggccgt	gatgtttctg	23160
atttactga	ttccgttcga	gatcctaata	catctgaaat	attagacatt	tcaccttgct	23220
cttttggggg	tgtaagtgtg	attacacctg	gaacaaatgc	ttcatctgaa	gttgctgttc	23280
tatatcaaga	tgttactgct	actgatgttt	ctacagcaat	tcatgcagat	caactcacac	23340
cagcttggcg	catatatctt	actggaaaca	atgtattcca	gactcaagca	ggctgtctta	23400
taggagctga	gcatgtcgac	acttcttatg	agtgcgacat	tcctattgga	gctggcattt	23460
gtgctagtta	ccatacagtt	tctttattac	gtagtactag	ccaaaaatct	atttgtggctt	23520
atactatgtc	tttaggtgct	gatagttcaa	ttgcttactc	taataacacc	attgctatac	23580
ctactaactt	ttcaattagc	attactacag	aagtaatgcc	tgtttctatg	gctaaaacct	23640
ccgtagattg	taatattgtac	atctgcggag	atttctactga	atgtgctaatt	ttgcttctcc	23700
aatatggtag	cttttgcaca	caactaaatc	gtgcactctc	aggtattgct	gctgaacagg	23760
atcgcaacac	acgtgaagtg	ttcgtcaag	tcaaacaat	gtacaaaacc	ccaactttga	23820
aatattttgg	tggttttaata	ttttcacaaa	tattacctga	ccctctaaag	ccaactaaga	23880
ggctttttat	tgaggacttg	ctctttaata	aggtgacact	cgctgatgct	ggcttcatga	23940
agcaatatgg	cgaatgccta	ggtgatatta	atgctagaga	tctcatttgt	gcgcagaagt	24000

S226CAS111.ST25

tcaatggact	tacagtgttg	ccacctctgc	tcaactgatga	tatgattgct	gcctacactg	24060
ctgctctagt	tagtggtact	gccactgctg	gatggacatt	tggtgctggc	gctgctcttc	24120
aaataccttt	tgctatgcaa	atggcatata	ggttcaatgg	cattggagtt	acccaaaatg	24180
ttctctatga	gaaccaaaaa	caaatcgcca	accaatttaa	caaggcgatt	agtcaaattc	24240
aagaatcact	tacaacaaca	tcaactgcat	tgggcaagct	gcaagacggt	gttaaccaga	24300
atgctcaagc	attaaacaca	cttgttaaac	aacttagctc	taattttggt	gcaatttcaa	24360
gtgtgctaaa	tgatatcctt	tcgcgacttg	ataaagtcga	ggcggaggta	caaattgaca	24420
ggttaattac	aggcagactt	caaagccttc	aaacctatgt	aacacaacaa	ctaatacagg	24480
ctgctgaaat	cagggcttct	gctaactctg	ctgctactaa	aatgtctgag	tgtgttcttg	24540
gacaatcaaa	aagagttgac	ttttgtggaa	agggtacca	ccttatgtcc	ttcccacaag	24600
cagccccgca	tggtgttgct	ttcctacatg	tcacgtatgt	gccatcccag	gagaggaact	24660
tcaccacagc	gccagcaatt	tgtcatgaag	gcaaagcata	cttcctctgt	gaagggtgtt	24720
ttgtgtttta	tggcacttct	tggtttatta	cacagaggaa	cttcttttct	ccacaaataa	24780
ttactacaga	caatacattt	gtctcaggaa	attgtgatgt	cgttattggc	atcattaaca	24840
acacagttta	tgatcctctg	caacctgagc	ttgactcatt	caaagaagag	ctggacaagt	24900
acttcaaaaa	tcatacatca	ccagatgttg	atcttggcga	catttcaggc	attaacgctt	24960
ctgtcgtcaa	cattcaaaaa	gaaattgacc	gcctcaatga	ggtcgctaaa	aatttaaagt	25020
aatcactcat	tgaccttcaa	gaattgggaa	aatatgagca	atatattaaa	tggccttggt	25080
atgtttggct	cggcttcatt	gctggactaa	ttgccatcgt	catggttaca	atcttgcttt	25140
gttgcatgac	tagttgttgc	agttgcctca	agggtgcatg	ctcttggtgt	tcttgctgca	25200
agtttgatga	ggatgactct	gagccagttc	tcaagggtgt	caaattacat	tacacataaa	25260
cgaacttatg	gatttgttta	tgagattttt	tactcttgga	tcaattactg	cacagccagt	25320
aaaaattgac	aatgcttctc	ctgcaagtac	tgttcatgct	acagcaacga	taccgctaca	25380
agcctcactc	cctttcggat	ggcttgttat	tggcgttgca	tttcttgctg	tttttcagag	25440
cgctaccaa	ataattgcgc	tcaataaaag	atggcagcta	gccctttata	agggttcca	25500
gttcatttgc	aatttactgc	tgctatttgt	taccatctat	tcacatcttt	tgcttgctgc	25560
tgcaggatat	gaggcgcaat	ttttgtacct	ctatgccttg	atatattttc	tacaatgcat	25620
caacgcatgt	agaattatta	tgagatgttg	gctttgttgg	aagtgcaaat	ccaagaacct	25680
attactttat	gatgccaact	actttgtttg	ctggcacaca	cataactatg	actactgtat	25740
accatataac	agtgtcacag	atacaattgt	cgttactgaa	ggtgacggca	tttcaacacc	25800
aaaactcaaa	gaagactacc	aaattggtgg	ttattctgag	gataggcact	cagggtgttaa	25860
agactatgtc	gttggtacatg	gctatttcac	cgaagtttac	taccagcttg	agtctacaca	25920
aattactaca	gacactggta	ttgaaaatgc	tacattcttc	atctttaaca	agcttggttaa	25980
agaccaccg	aatgtgcaaa	tacacacaat	cgacggctct	tcaggagttg	ctaataccagc	26040



S226CAS111.ST25

aatggatcca	atttatgatg	agccgacgac	gactactagc	gtgcctttgt	aagcacaaga	26100
aagtgagtac	gaacttatgt	actcattcgt	ttcgggaagaa	acaggtacgt	taatagttaa	26160
tagcgtaactt	ctttttcttg	ctttcgtggt	attcttgcta	gtcacactag	ccatccttac	26220
tgcgcttcga	ttgtgtgcgt	actgctgcaa	tattgttaac	gtgagtttag	taaaaccaac	26280
ggtttacgtc	tactcgcgtg	ttaaaaatct	gaactcttct	gaaggagttc	ctgatcttct	26340
ggctctaaacg	aactaactat	tattattatt	ctgtttggaa	ctttaacatt	gcttatcatg	26400
gcagacaacg	gtactattac	cgttgaggag	cttaaacaac	tcctggaaca	atggaaccta	26460
gtaatagggt	tcctattcct	agcctggatt	atgttactac	aatttgccta	ttctaatacg	26520
aacagggtttt	tgtacataat	aaagcttggt	ttcctctggc	tcttggtggc	agtaacactt	26580
gcttggttttg	tgcttgctgc	tgtctacaga	attaattggg	tgactggcgg	gattgcgatt	26640
gcaatggctt	gtattgtagg	cttgatgtgg	cttagctact	tcgttgcttc	cttcaggctg	26700
tttgctcgtg	cccgtcaat	gtggtcattc	aaccagaaa	caaacattct	tctcaatgtg	26760
cctctccggg	ggacaattgt	gaccagaccg	ctcatggaaa	gtgaacttgt	cattgggtgct	26820
gtgatcattc	gtggtcactt	gcgaatggcc	ggacactccc	tagggcgctg	tgacattaag	26880
gacctgccaa	aagagatcac	tgtggctaca	tcacgaacgc	tttcttatta	caaattagga	26940
gcgtcgcagc	gtgtaggcac	tgattcaggt	tttgctgcat	acaaccgcta	ccgtattgga	27000
aactataaat	taaatacaga	ccacgccggt	agcaacgaca	atattgcttt	gctagtacag	27060
taagtgacaa	cagatgtttc	atcttggtga	cttcagggtt	acaatagcag	agatattgat	27120
tatcattatg	aggactttca	ggattgctat	ttggaatctt	gacgttataa	taagttcaat	27180
agtgagacaa	ttattttaagc	ctctaactaa	gaagaattat	tcggagttag	atgatgaaga	27240
acctatggag	ttagattatc	cataaaacga	acatgaaaat	tattctcttc	ctgacattga	27300
ttgtatttac	atcttgcgag	ctatatcact	atcaggagtg	tgtagaggt	acgactgtac	27360
tactaaaaga	accttgccca	tcaggaacat	acgagggcaa	ttcaccattt	caccctcttg	27420
ctgacaataa	atttgcacta	acttgcacta	gcacacactt	tgcttttgct	tgtgctgacg	27480
gtactcgaca	tacctatcag	ctgcgtgcaa	gatcagtttc	acaaaaactt	ttcatcagac	27540
aagaggaggt	tcaacaagag	ctctactcgc	cactttttct	cattgttgct	gctctagtat	27600
ttttaatact	ttgcttcacc	attaagagaa	agacagaatg	aatgagctca	ctttaattga	27660
cttctatttg	tgcttttttag	cctttctgct	attccttggt	ttaataatgc	ttattatatt	27720
ttggttttca	ctcgaaatcc	aggatctaga	agaaccttg	accaaagtct	aaacgaacat	27780
gaaacttctc	attgttttga	cttgtatttc	tctatgcagt	tgcatatgca	ctgtagtaca	27840
gcgctgtgca	tctaataaac	ctcatgtgct	tgaagatcct	tgtaaggtag	aacactaggg	27900
gtaatactta	tagcactgct	tggctttgtg	ctctaggaaa	ggttttacct	tttcatagat	27960
ggcacactat	ggttcaaaca	tgcacaccta	atgttactat	caactgtcaa	gatccagctg	28020
gtggtgcgct	tatagctagg	tggttggtacc	ttcatgaagg	tcaccaaact	gctgcattta	28080

S226CAS111.ST25

gagacgtact	tgttgtttta	aataaacgaa	caaattaaaa	tgtctgataa	tggaacccaa	28140
tcaaaccaac	gtagtgcacc	cgcattaca	tttgggtggac	ccacagattc	aactgacaat	28200
aaccagaatg	gaggacgcaa	tggggcaagg	ccaaaacagc	gccgacccca	aggtttaccc	28260
aataatactg	cgtcttggtt	cacagctctc	actcagcatg	gcaaggagga	acttagattc	28320
cctcgaggcc	agggcggtcc	aatcaacacc	aatagtgggtc	cagatgacca	aattgggtac	28380
taccgaagag	ctacccgacg	agttcgtggt	ggtgacggca	aaatgaaaga	gctcagcccc	28440
agatggtact	tctattacct	aggaactggc	ccagaagctt	cacttcctta	cggcgctaac	28500
aaagaaggca	tcgtatgggt	tgcaactgag	ggagccttga	atacacccaa	agaccacatt	28560
ggcaccgcga	atcctaataa	caatgctgcc	accgtgctac	aacttcctca	aggaacaaca	28620
ttgccaaaag	gcttctacgc	agaggggaagc	agaggcggca	gtcaagcctc	ttctcgctcc	28680
tcatacacgta	gtcgcggtaa	ttcaagaaat	tcaactcctg	gcagcagtag	gggaaattct	28740
cctgctcgaa	tggctagcgg	aggtggtgaa	actgccctcg	cgctattgct	gctagacaga	28800
ttgaaccagc	ttgagagcaa	agtttctggt	aaaggccaac	aacaacaagg	ccaaactgtc	28860
actaagaaat	ctgctgctga	ggcatctaaa	aagcctcgcc	aaaaacgtac	tgccacaaaa	28920
cagtacaacg	tcactcaagc	atttgggaga	cgtggtccag	aacaaaccca	aggaaatttc	28980
ggggaccaag	acctaatacag	acaaggaact	gattacaaac	attggccgca	aattgcacaa	29040
tttgtccaa	gtgcctctgc	attctttgga	atgtcacgca	ttggcatgga	agtcacacct	29100
tcgggaacat	ggctgactta	tcattggagcc	attaaattgg	atgacaaaga	tccacaattc	29160
aaagacaacg	tcatactgct	gaacaagcac	attgacgcat	acaaaacatt	cccaccaaca	29220
gagcctaaaa	aggacaaaaa	gaaaaagact	gatgaagctc	agcctttgcc	gcagagacaa	29280
aagaagcagc	ccactgtgac	tcttcttcct	gcggctgaca	tggatgattt	ctccagacaa	29340
cttcaaaatt	ccatgagtgg	agcttctgct	gattcaactc	aggcataaac	actcatgatg	29400
accacacaag	gcagatgggc	tatgtaaacg	ttttcgcaat	tccgtttacg	atacatagtc	29460
tactcttggtg	cagaatgaat	tctcgtaact	aaacagcaca	agtaggttta	gttaacttta	29520
atctcacata	gcaatcttta	atcaatgtgt	aacattaggg	aggacttgaa	agagccacca	29580
cattttcatc	gaggccacgc	ggagtacgat	cgagggtaca	gtgaataatg	ctagggagag	29640
ctgcctatat	ggaagagccc	taatgtgtaa	aattaatttt	agtagtgcta	tccccatgtg	29700
attttaatag	cttcttagga	gaatgacaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa		29746

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3945

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;220&gt;

S226CAS111.ST25

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (89)..(3853)

&lt;223&gt;

```

<400> 2
ttctcttctg gaaaaaggta ggcttatcat tagagaaaac aacagagttg tggtttcaag      60
tgatattctt gttaacaact aaacgaac atg ttt att ttc tta tta ttt ctt      112
                               Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu
                               1                               5

act ctc act agt ggt agt gac ctt gac cgg tgc acc act ttt gat gat      160
Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp
10                               15                               20

ggt caa gct cct aat tac act caa cat act tca tct atg agg ggg gtt      208
Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val
25                               30                               35                               40

tac tat cct gat gaa att ttt aga tca gac act ctt tat tta act cag      256
Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln
45                               50                               55

gat tta ttt ctt cca ttt tat tct aat gtt aca ggg ttt cat act att      304
Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile
60                               65                               70

aat cat acg ttt ggc aac cct gtc ata cct ttt aag gat ggt att tat      352
Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr
75                               80                               85

ttt gct gcc aca gag aaa tca aat gtt gtc cgt ggt tgg gtt ttt ggt      400
Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly
90                               95                               100

tct acc atg aac aac aag tca cag tcg gtg att att att aac aat tct      448
Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser
105                               110                               115

act aat gtt gtt ata cga gca tgt aac ttt gaa ttg tgt gac aac cct      496
Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro
125                               130                               135

ttc ttt gct gtt tct aaa ccc atg ggt aca cag aca cat act atg ata      544
Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile
140                               145                               150

ttc gat aat gca ttt aat tgc act ttc gag tac ata tct gat gcc ttt      592
Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe
155                               160                               165

tcg ctt gat gtt tca gaa aag tca ggt aat ttt aaa cac tta cga gag      640
Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu
170                               175                               180

ttt gtg ttt aaa aat aaa gat ggg ttt ctc tat gtt tat aag ggc tat      688
Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr
185                               190                               195                               200

caa cct ata gat gta gtt cgt gat cta cct tct ggt ttt aac act ttg      736
Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu
205                               210                               215

```

S226CAS111.ST25																
aaa Lys	cct Pro	att Ile	ttt Phe 220	aag Lys	ttg Leu	cct Pro	ctt Leu	ggt Gly 225	att Ile	aac Asn	att Ile	aca Thr	aat Asn 230	ttt Phe	aga Arg	
gcc Ala	att Ile	ctt Leu 235	aca Thr	gcc Ala	ttt Phe	tca Ser	cct Pro 240	gct Ala	caa Gln	gac Asp	att Ile	tgg Trp 245	ggc Gly	acg Thr	tca Ser	832
gct Ala	gca Ala 250	gcc Ala	tat Tyr	ttt Phe	gtt Val	ggc Gly 255	tat Tyr	tta Leu	aag Lys	cca Pro	act Thr 260	aca Thr	ttt Phe	atg Met	ctc Leu	880
aag Lys 265	tat Tyr	gat Asp	gaa Glu	aat Asn	ggt Gly 270	aca Thr	atc Ile	aca Thr	gat Asp	gct Ala 275	gtt Val	gat Asp	tgt Cys	tct Ser	caa Gln 280	928
aat Asn	cca Pro	ctt Leu	gct Ala	gaa Glu 285	ctc Leu	aaa Lys	tgc Cys	tct Ser	gtt Val 290	aag Lys	agc Ser	ttt Phe	gag Glu	att Ile 295	gac Asp	976
aaa Lys	gga Gly	att Ile	tac Tyr 300	cag Gln	acc Thr	tct Ser	aat Asn	ttc Phe 305	agg Arg	gtt Val	gtt Val	ccc Pro	tca Ser 310	gga Gly	gat Asp	1024
gtt Val	gtg Val	aga Arg 315	ttc Phe	cct Pro	aat Asn	att Ile	aca Thr 320	aac Asn	ttg Leu	tgt Cys	cct Pro	ttt Phe 325	gga Gly	gag Glu	gtt Val	1072
ttt Phe 330	aat Asn	gct Ala	act Thr	aaa Lys	ttc Phe	cct Pro 335	tct Ser	gtc Val	tat Tyr	gca Ala	tgg Trp 340	gag Glu	aga Arg	aaa Lys	aaa Lys	1120
att Ile 345	tct Ser	aat Asn	tgt Cys	gtt Val	gct Ala 350	gat Asp	tac Tyr	tct Ser	gtg Val	ctc Leu 355	tac Tyr	aac Asn	tca Ser	aca Thr	ttt Phe 360	1168
ttt Phe	tca Ser	acc Thr	ttt Phe	aag Lys 365	tgc Cys	tat Tyr	ggc Gly	gtt Val	tct Ser 370	gcc Ala	act Thr	aag Lys	ttg Leu	aat Asn 375	gat Asp	1216
ctt Leu	tgc Cys	ttc Phe	tcc Ser 380	aat Asn	gtc Val	tat Tyr	gca Ala	gat Asp 385	tct Ser	ttt Phe	gta Val	gtc Val	aag Lys 390	gga Gly	gat Asp	1264
gat Asp	gta Val	aga Arg 395	caa Gln	ata Ile	gcg Ala	cca Pro	gga Gly 400	caa Gln	act Thr	ggt Gly	gtt Val	att Ile 405	gct Ala	gat Asp	tat Tyr	1312
aat Asn	tat Tyr 410	aaa Lys	ttg Leu	cca Pro	gat Asp	gat Asp 415	ttc Phe	atg Met	ggt Gly	tgt Cys	gtc Val 420	ctt Leu	gct Ala	tgg Trp	aat Asn	1360
act Thr 425	agg Arg	aac Asn	att Ile	gat Asp	gct Ala 430	act Thr	tca Ser	act Thr	ggt Gly	aat Asn 435	tat Tyr	aat Asn	tat Tyr	aaa Lys	tat Tyr 440	1408
agg Arg	tat Tyr	ctt Leu	aga Arg	cat His 445	ggc Gly	aag Lys	ctt Leu	agg Arg	ccc Pro 450	ttt Phe	gag Glu	aga Arg	gac Asp	ata Ile 455	tct Ser	1456
aat Asn	gtg Val	cct Pro	ttc Phe 460	tcc Ser	cct Pro	gat Asp	ggc Gly	aaa Lys 465	cct Pro	tgc Cys	acc Thr	cca Pro	cct Pro 470	gct Ala	ctt Leu	1504
aat Asn	tgt Cys	tat Tyr 475	tgg Trp	cca Pro	tta Leu	aat Asn	gat Asp 480	tat Tyr	ggt Gly	ttt Phe	tac Tyr	acc Thr 485	act Thr	act Thr	ggc Gly	1552

S226CAS111.ST25																
att	ggc	tac	caa	cct	tac	aga	ggt	gta	gta	ctt	tct	ttt	gaa	ctt	tta	
Ile	Gly	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Arg	Val	Val	Val	Leu	Ser	Phe	Glu	Leu	Leu	1600
490						495					500					
aat	gca	ccg	gcc	acg	ggt	tgt	gga	cca	aaa	tta	tcc	act	gac	ctt	att	1648
Asn	Ala	Pro	Ala	Thr	Val	Cys	Gly	Pro	Lys	Leu	Ser	Thr	Asp	Leu	Ile	
505					510					515					520	
aag	aac	cag	tgt	gtc	aat	ttt	aat	ttt	aat	gga	ctc	act	ggt	act	ggt	1696
Lys	Asn	Gln	Cys	Val	Asn	Phe	Asn	Phe	Asn	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Gly	
			525						530				535			
gtg	tta	act	cct	tct	tca	aag	aga	ttt	caa	cca	ttt	caa	caa	ttt	ggc	1744
Val	Leu	Thr	Pro	Ser	Ser	Lys	Arg	Phe	Gln	Pro	Phe	Gln	Gln	Phe	Gly	
			540					545					550			
cgt	gat	ggt	tct	gat	ttc	act	gat	tcc	ggt	cga	gat	cct	aaa	aca	tct	1792
Arg	Asp	Val	Ser	Asp	Phe	Thr	Asp	Ser	Val	Arg	Asp	Pro	Lys	Thr	Ser	
		555					560					565				
gaa	ata	tta	gac	att	tca	cct	tgc	tct	ttt	ggg	ggt	gta	agt	gta	att	1840
Glu	Ile	Leu	Asp	Ile	Ser	Pro	Cys	Ser	Phe	Gly	Gly	Val	Ser	Val	Ile	
	570					575					580					
aca	cct	gga	aca	aat	gct	tca	tct	gaa	ggt	gct	ggt	cta	tat	caa	gat	1888
Thr	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala	Ser	Ser	Glu	Val	Ala	Val	Leu	Tyr	Gln	Asp	
585					590					595					600	
ggt	aac	tgc	act	gat	ggt	tct	aca	gca	att	cat	gca	gat	caa	ctc	aca	1936
Val	Asn	Cys	Thr	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	His	Ala	Asp	Gln	Leu	Thr	
				605					610					615		
cca	gct	tgg	cgc	ata	tat	tct	act	gga	aac	aat	gta	ttc	cag	act	caa	1984
Pro	Ala	Trp	Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Gly	Asn	Asn	Val	Phe	Gln	Thr	Gln	
			620					625					630			
gca	ggc	tgt	ctt	ata	gga	gct	gag	cat	gtc	gac	act	tct	tat	gag	tgc	2032
Ala	Gly	Cys	Leu	Ile	Gly	Ala	Glu	His	Val	Asp	Thr	Ser	Tyr	Glu	Cys	
		635					640					645				
gac	att	cct	att	gga	gct	ggc	att	tgt	gct	agt	tac	cat	aca	ggt	tct	2080
Asp	Ile	Pro	Ile	Gly	Ala	Gly	Ile	Cys	Ala	Ser	Tyr	His	Thr	Val	Ser	
	650					655					660					
tta	tta	cgt	agt	act	agc	caa	aaa	tct	att	gtg	gct	tat	act	atg	tct	2128
Leu	Leu	Arg	Ser	Thr	Ser	Gln	Lys	Ser	Ile	Val	Ala	Tyr	Thr	Met	Ser	
665					670					675					680	
tta	ggt	gct	gat	agt	tca	att	gct	tac	tct	aat	aac	acc	att	gct	ata	2176
Leu	Gly	Ala	Asp	Ser	Ser	Ile	Ala	Tyr	Ser	Asn	Asn	Thr	Ile	Ala	Ile	
				685				690						695		
cct	act	aac	ttt	tca	att	agc	att	act	aca	gaa	gta	atg	cct	ggt	tct	2224
Pro	Thr	Asn	Phe	Ser	Ile	Ser	Ile	Thr	Thr	Glu	Val	Met	Pro	Val	Ser	
			700					705					710			
atg	gct	aaa	acc	tcc	gta	gat	tgt	aat	atg	tac	atc	tgc	gga	gat	tct	2272
Met	Ala	Lys	Thr	Ser	Val	Asp	Cys	Asn	Met	Tyr	Ile	Cys	Gly	Asp	Ser	
		715					720					725				
act	gaa	tgt	gct	aat	ttg	ctt	ctc	caa	tat	ggt	agc	ttt	tgc	aca	caa	2320
Thr	Glu	Cys	Ala	Asn	Leu	Leu	Leu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Phe	Cys	Thr	Gln	
	730					735					740					
cta	aat	cgt	gca	ctc	tca	ggt	att	gct	gct	gaa	cag	gat	cgc	aac	aca	2368
Leu	Asn	Arg	Ala	Leu	Ser	Gly	Ile	Ala	Ala	Glu	Gln	Asp	Arg	Asn	Thr	
745					750					755					760	

S226CAS111.ST25																
cgt	gaa	gtg	ttc	gct	caa	gtc	aaa	caa	atg	tac	aaa	acc	cca	act	ttg	
Arg	Glu	Val	Phe	Ala	Gln	Val	Lys	Gln	Met	Tyr	Lys	Thr	Pro	Thr	Leu	2416
				765					770					775		
aaa	tat	ttt	ggg	ggg	ttt	aat	ttt	tca	caa	ata	tta	cct	gac	cct	cta	2464
Lys	Tyr	Phe	Gly	Gly	Phe	Asn	Phe	Ser	Gln	Ile	Leu	Pro	Asp	Pro	Leu	
			780					785					790			
aag	cca	act	aag	agg	tct	ttt	att	gag	gac	ttg	ctc	ttt	aat	aag	gtg	2512
Lys	Pro	Thr	Lys	Arg	Ser	Phe	Ile	Glu	Asp	Leu	Leu	Phe	Asn	Lys	Val	
		795					800					805				
aca	ctc	gct	gat	gct	ggc	ttc	atg	aag	caa	tat	ggc	gaa	tgc	cta	ggg	2560
Thr	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly	Phe	Met	Lys	Gln	Tyr	Gly	Glu	Cys	Leu	Gly	
	810					815					820					
gat	att	aat	gct	aga	gat	ctc	att	tgt	gcg	cag	aag	ttc	aat	gga	ctt	2608
Asp	Ile	Asn	Ala	Arg	Asp	Leu	Ile	Cys	Ala	Gln	Lys	Phe	Asn	Gly	Leu	
					830					835					840	
aca	gtg	ttg	cca	cct	ctg	ctc	act	gat	gat	atg	att	gct	gcc	tac	act	2656
Thr	Val	Leu	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Asp	Asp	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Thr	
				845					850					855		
gct	gct	cta	gtt	agt	ggg	act	gcc	act	gct	gga	tgg	aca	ttt	ggg	gct	2704
Ala	Ala	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Trp	Thr	Phe	Gly	Ala	
			860					865					870			
ggc	gct	gct	ctt	caa	ata	cct	ttt	gct	atg	caa	atg	gca	tat	agg	ttc	2752
Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Pro	Phe	Ala	Met	Gln	Met	Ala	Tyr	Arg	Phe	
		875					880					885				
aat	ggc	att	gga	gtt	acc	caa	aat	gtt	ctc	tat	gag	aac	caa	aaa	caa	2800
Asn	Gly	Ile	Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Val	Leu	Tyr	Glu	Asn	Gln	Lys	Gln	
	890					895					900					
atc	gcc	aac	caa	ttt	aac	aag	gcg	att	agt	caa	att	caa	gaa	tca	ctt	2848
Ile	Ala	Asn	Gln	Phe	Asn	Lys	Ala	Ile	Ser	Gln	Ile	Gln	Glu	Ser	Leu	
	905				910					915					920	
aca	aca	aca	tca	act	gca	ttg	ggc	aag	ctg	caa	gac	gtt	gtt	aac	cag	2896
Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Gly	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	Val	Asn	Gln	
				925					930					935		
aat	gct	caa	gca	tta	aac	aca	ctt	gtt	aaa	caa	ctt	agc	tct	aat	ttt	2944
Asn	Ala	Gln	Ala	Leu	Asn	Thr	Leu	Val	Lys	Gln	Leu	Ser	Ser	Asn	Phe	
			940					945					950			
ggg	gca	att	tca	agt	gtg	cta	aat	gat	atc	ctt	tcg	cga	ctt	gat	aaa	2992
Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Val	Leu	Asn	Asp	Ile	Leu	Ser	Arg	Leu	Asp	Lys	
		955					960					965				
gtc	gag	gcg	gag	gta	caa	att	gac	agg	tta	att	aca	ggc	aga	ctt	caa	3040
Val	Glu	Ala	Glu	Val	Gln	Ile	Asp	Arg	Leu	Ile	Thr	Gly	Arg	Leu	Gln	
	970					975					980					
agc	ctt	caa	acc	tat	gta	aca	caa	caa	cta	atc	agg	gct	gct	gaa	atc	3088
Ser	Leu	Gln	Thr	Tyr	Val	Thr	Gln	Gln	Leu	Ile	Arg	Ala	Ala	Glu	Ile	
					990					995					1000	
agg	gct	tct	gct	aat	ctt	gct	gct	act	aaa	atg	tct	gag	tgt	gtt		3133
Arg	Ala	Ser	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Thr	Lys	Met	Ser	Glu	Cys	Val		
				1005					1010					1015		
ctt	gga	caa	tca	aaa	aga	gtt	gac	ttt	tgt	gga	aag	ggc	tac	cac		3178
Leu	Gly	Gln	Ser	Lys	Arg	Val	Asp	Phe	Cys	Gly	Lys	Gly	Tyr	His		
				1020					1025					1030		

S226CAS111.ST25															
ctt Leu	atg Met	tcc Ser	ttc Phe	cca Pro 1035	caa Gln	gca Ala	gcc Ala	ccg Pro	cat His 1040	ggt Gly	gtt Val	gtc Val	ttc Phe	cta Leu 1045	3223
cat His	gtc Val	acg Thr	tat Tyr	gtg Val 1050	cca Pro	tcc Ser	cag Gln	gag Glu	agg Arg 1055	aac Asn	ttc Phe	acc Thr	aca Thr	gcg Ala 1060	3268
cca Pro	gca Ala	att Ile	tgt Cys	cat His 1065	gaa Glu	ggc Gly	aaa Lys	gca Ala	tac Tyr 1070	ttc Phe	cct Pro	cgt Arg	gaa Glu	ggt Gly 1075	3313
gtt Val	ttt Phe	gtg Val	ttt Phe	aat Asn 1080	ggc Gly	act Thr	tct Ser	tgg Trp	ttt Phe 1085	att Ile	aca Thr	cag Gln	agg Arg	aac Asn 1090	3358
ttc Phe	ttt Phe	tct Ser	cca Pro	caa Gln 1095	ata Ile	att Ile	act Thr	aca Thr	gac Asp 1100	aat Asn	aca Thr	ttt Phe	gtc Val	tca Ser 1105	3403
gga Gly	aat Asn	tgt Cys	gat Asp	gtc Val 1110	gtt Val	att Ile	ggc Gly	atc Ile	att Ile 1115	aac Asn	aac Asn	aca Thr	gtt Val	tat Tyr 1120	3448
gat Asp	cct Pro	ctg Leu	caa Gln	cct Pro 1125	gag Glu	ctt Leu	gac Asp	tca Ser	ttc Phe 1130	aaa Lys	gaa Glu	gag Glu	ctg Leu	gac Asp 1135	3493
aag Lys	tac Tyr	ttc Phe	aaa Lys	aat Asn 1140	cat His	aca Thr	tca Ser	cca Pro	gat Asp 1145	gtt Val	gat Asp	ctt Leu	ggc Gly	gac Asp 1150	3538
att Ile	tca Ser	ggc Gly	att Ile	aac Asn 1155	gct Ala	tct Ser	gtc Val	gtc Val	aac Asn 1160	att Ile	caa Gln	aaa Lys	gaa Glu	att Ile 1165	3583
gac Asp	cgc Arg	ctc Leu	aat Asn	gag Glu 1170	gtc Val	gct Ala	aaa Lys	aat Asn	tta Leu 1175	aat Asn	gaa Glu	tca Ser	ctc Leu	att Ile 1180	3628
gac Asp	ctt Leu	caa Gln	gaa Glu	ttg Leu 1185	gga Gly	aaa Lys	tat Tyr	gag Glu	caa Gln 1190	tat Tyr	att Ile	aaa Lys	tgg Trp	cct Pro 1195	3673
tgg Trp	tat Tyr	gtt Val	tgg Trp	ctc Leu 1200	ggc Gly	ttc Phe	att Ile	gct Ala	gga Gly 1205	cta Leu	att Ile	gcc Ala	atc Ile	gtc Val 1210	3718
atg Met	gtt Val	aca Thr	atc Ile	ttg Leu 1215	ctt Leu	tgt Cys	tgc Cys	atg Met	act Thr 1220	agt Ser	tgt Cys	tgc Cys	agt Ser	tgc Cys 1225	3763
ctc Leu	aag Lys	ggt Gly	gca Ala	tgc Cys 1230	tct Ser	tgt Cys	ggt Gly	tct Ser	tgc Cys 1235	tgc Cys	aag Lys	ttt Phe	gat Asp	gag Glu 1240	3808
gat Asp	gac Asp	tct Ser	gag Glu	cca Pro 1245	gtt Val	ctc Leu	aag Lys	ggt Gly	gtc Val 1250	aaa Lys	tta Leu	cat His	tac Tyr	aca Thr 1255	3853
taaacgaact tatggatttg tttatgagat tttttactct tggatcaatt actgcacagc															3913
cagtaaaaaat tgacaatgct tctcctgcaa gt															3945

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1255

S226CAS111.ST25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 3

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu  
 1 5 10 15

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
 20 25 30

His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
 35 40 45

Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
 50 55 60

Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
 65 70 75 80

Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
 85 90 95

Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
 100 105 110

Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
 115 120 125

Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
 130 135 140

Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
 145 150 155 160

Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
 165 170 175

Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
 180 185 190

Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
 195 200 205

Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu  
 210 215 220

Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro  
 225 230 235 240



S226CAS111.ST25

Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr  
 245 250 255  
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile  
 260 265 270  
 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys  
 275 280 285  
 Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn  
 290 295 300  
 Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser  
 325 330 335  
 Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr  
 340 345 350  
 Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly  
 355 360 365  
 Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala  
 370 375 380  
 Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe  
 405 410 415  
 Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser  
 420 425 430  
 Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu  
 435 440 445  
 Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly  
 450 455 460  
 Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp  
 465 470 475 480  
 Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val  
 485 490 495  
 Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly  
 500 505 510

## S226CAS111.ST25

Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn  
 515 520 525  
 Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg  
 530 535 540  
 Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp  
 545 550 555 560  
 Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys  
 565 570 575  
 Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser  
 580 585 590  
 Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr  
 595 600 605  
 Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr  
 610 615 620  
 Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu  
 625 630 635 640  
 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile  
 645 650 655  
 Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys  
 660 665 670  
 Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala  
 675 680 685  
 Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile  
 690 695 700  
 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys  
 705 710 715 720  
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu  
 725 730 735  
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile  
 740 745 750  
 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys  
 755 760 765  
 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe  
 770 775 780

## S226CAS111.ST25

Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile  
 785 790 795 800  
 Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met  
 805 810 815  
 Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile  
 820 825 830  
 Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr  
 835 840 845  
 Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala  
 850 855 860  
 Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe  
 865 870 875 880  
 Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn  
 885 890 895  
 Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala  
 900 905 910  
 Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly  
 915 920 925  
 Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu  
 930 935 940  
 Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn  
 945 950 955 960  
 Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp  
 965 970 975  
 Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln  
 980 985 990  
 Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala  
 995 1000 1005  
 Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp  
 1010 1015 1020  
 Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala  
 1025 1030 1035  
 Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln  
 1040 1045 1050

## S226CAS111.ST25

Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys  
 1055 1060 1065  
 Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser  
 1070 1075 1080  
 Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr  
 1085 1090 1095  
 Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly  
 1100 1105 1110  
 Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp  
 1115 1120 1125  
 Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser  
 1130 1135 1140  
 Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val  
 1145 1150 1155  
 Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys  
 1160 1165 1170  
 Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr  
 1175 1180 1185  
 Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu Gly Phe Ile  
 1190 1195 1200  
 Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Leu Leu Cys Cys  
 1205 1210 1215  
 Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Ala Cys Ser Cys Gly  
 1220 1225 1230  
 Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys  
 1235 1240 1245  
 Gly Val Lys Leu His Tyr Thr  
 1250 1255

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 3943

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 4

S226CAS111.ST25

ctcttctgga aaaaggtagg cttatcatta gagaaaacaa cagagttgtg gtttcaagtg	60
atattcttgt taacaactaa acgaacatgt ttattttctt attatttctt actctcacta	120
gtggtagtga ccttgaccgg tgcaccactt ttgatgatgt tcaagctcct aattacactc	180
aacatacttc atctatgagg ggggtttact atcctgatga aattttttaga tcagacactc	240
tttatttaac tcaggattta tttcttccat tttattctaa tgttacaggg tttcatacta	300
ttaatcatac gtttggcaac cctgtcatac cttttaagga tggattttat tttgctgcca	360
cagagaaatc aaatgttgct cgtggttggg ttttggttc taccatgaac aacaagtcac	420
agtcggtgat tattattaac aattctacta atgttgttat acgagcatgt aactttgaat	480
tgtgtgacaa ccctttcttt gctgtttcta aacccatggg tacacagaca catactatga	540
tattcgataa tgcatttaat tgcactttcg agtacatata tgatgccttt tcgcttgatg	600
tttcagaaaa gtcaggtaat tttaaacact tacgagagtt tgtgtttaaa aataaagatg	660
ggtttctcta tgtttataag ggctatcaac ctatagatgt agttcgatg ctaccttctg	720
gttttaacac ttgaaacct atttttaagt tgcctcttgg tattaacatt acaaatttta	780
gagccattct tacagccttt tcacctgctc aagacatttg gggcacgtca gctgcagcct	840
attttgttgg ctatttaaag ccaactacat ttatgctcaa gtatgatgaa aatgggtacaa	900
tcacagatgc tgttgattgt tctcaaaatc cacttgctga actcaaatgc tctgttaaga	960
gctttgagat tgacaaagga atttaccaga cctctaattt cagggttgtt ccctcaggag	1020
atgttgtgag attccctaatt attacaaact tgtgtccttt tggagagggt tttaatgcta	1080
ctaaattccc ttctgtctat gcatgggaga gaaaaaaaaat ttctaattgt gttgctgatt	1140
actctgtgct ctacaactca acattttttt caacctttta gtgctatggc gtttctgcca	1200
ctaagttgaa tgatctttgc ttctccaatg tctatgcaga ttcttttgta gtcaagggag	1260
atgatgtaag acaaatagcg ccaggacaaa ctgggtgttat tgctgattat aattataaat	1320
tgccagatga tttcatgggt tgtgtccttg cttggaatac taggaacatt gatgctactt	1380
caactggtaa ttataattat aaatataggt atcttagaca tggcaagctt aggccctttg	1440
agagagacat atctaattgt cctttctccc ctgatggcaa accttgacc ccacctgctc	1500
ttaattgtta ttggccatta aatgattatg gtttttacac cactactggc attggctacc	1560
aaccttacag agttgtagta ctttcttttg aactttttaa tgcaccggcc acggtttgtg	1620
gaccaaatt atccactgac cttattaaga accagtgtgt caattttaat tttaatggac	1680
tcactggtac tgggtgtgta actccttctt caaagagatt tcaaccattt caacaatttg	1740
gccgtgatgt ctctgatttc actgattccg ttcgagatcc taaaacatct gaaatattag	1800
acatttcacc ttgctctttt ggggggtgtaa gtgtaattac acctggaaca aatgcttcat	1860
ctgaagttgc tgttctatat caagatgtta actgcactga tgtttctaca gcaatccatg	1920
cagatcaact cacaccagct tggcgcatat attctactgg aaacaatgta ttccagactc	1980
aagcaggctg tcttatagga gctgagcatg tcgacacttc ttatgagtgc gacattccta	2040

S226CAS111.ST25

ttggagctgg catttgtgct agttaccata cagtttcttt attacgtagt actagccaaa	2100
aatctattgt ggcttatact atgtcttttag gtgctgatag ttcaattgct tactctaata	2160
acaccattgc tatacctact aacttttcaa ttagcattac tacagaagta atgcctgttt	2220
ctatggctaa aacctccgta gattgtaata tgtacatctg cggagattct actgaatgtg	2280
ctaatttgct tctccaatat ggtagctttt gcacacaact aaatcgtgca ctctcaggta	2340
ttgctgctga acaggatcgc aacacacgtg aagtgttcgc tcaagtcaaa caaatgtaca	2400
aaaccccaac tttgaaatat tttggtgggt ttaatttttc acaaataatta cctgaccctc	2460
taaagccaac taagaggctt tttattgagg acttgctctt taataagggtg aactcgctg	2520
atgctggctt catgaagcaa tatggcgaat gcctagggtga tattaatgct agagatctca	2580
tttgtgctga gaagttcaat gggcttacag tggtgccacc tctgctcact gatgatatga	2640
ttgctgccta cactgctgct ctagttagtg gtactgccac tgctggatgg acatttggtg	2700
ctggcgctgc tcttcaaata ccttttgcta tgcaaattggc atatagggtt aatggcattg	2760
gagttacca aaatgttctc tatgagaacc aaaaacaaat cgccaaccaa tttaacaagg	2820
cgattagtca aattcaagaa tcacttaca caacatcaac tgcattgggc aagctgcaag	2880
acgttggtta ccagaatgct caagcattaa acacacttgt taaacaactt agctctaatt	2940
ttggtgcaat ttcaagtgtg ctaaatagata tcctttcgcg acttgataaa gtcgaggcgg	3000
aggtacaaat tgacaggcta attacaggca gacttcaaag ctttcaaacc tatgtaacac	3060
aacaactaat cagggctgct gaaatcaggg cttctgctaa tcttgctgct actaaaatgt	3120
ctgagtgtgt tcttggacaa tcaaaaagag ttgacttttg tggaaagggc taccacctta	3180
tgctccttccc acaagcagcc ccgcatgggt ttgtcttctt acatgtcacg tatgtgccat	3240
cccaggagag gaacttcacc acagcgccag caatttgtca tgaaggcaaa gcatacttcc	3300
ctcgtgaagg tgtttttgtg tttaatggca cttcttggtt tattacacag aggaacttct	3360
tttctccaca aataattact acagacaata catttgtctc aggaaattgt gatgtcggtta	3420
ttggcatcat taacaacaca gtttatgatc ctctgcaacc tgagcttgac tcattcaaag	3480
aagagctgga caagtacttc aaaaatcata catcaccaga tgttgatctt ggcgacattt	3540
caggcattaa cgcttctgtc gtcaacattc aaaaagaaat tgaccgcctc aatgaggctg	3600
ctaaaaattt aaatgaatca ctcatggacc ttcaagaatt gggaaaatat gagcaatata	3660
ttaaatggcc ttggtatgtt tggctcggct tcattgctgg actaattgcc atcgtcatgg	3720
ttacaatctt gctttgttgc atgactagtt gttgcagttg cctcaagggt gcatgctctt	3780
gtggttcttg ctgcaagttt gatgaggatg actctgagcc agttctcaag ggtgtcaa	3840
tacattacac ataaacgaac ttatggattt gtttatgaga ttttttactc ttggatcaat	3900
tactgcacag ccagtaaaaa ttgacaatgc ttctcctgca agt	3943

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2049

## S226CAS111.ST25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

```

<400> 5
ctcttctgga aaaaggtagg cttatcatta gagaaaacaa cagagttgtg gtttcaagtg      60
atattcttgt taacaactaa acgaacatgt ttattttctt attatttctt actctcacta      120
gtggtagtga ccttgaccgg tgcaccactt ttgatgatgt tcaagctcct aattacactc      180
aacatacttc atctatgagg ggggtttact atcctgatga aattttttaga tcagacactc      240
tttatttaac tcaggattta tttcttccat tttattctaa tgttacaggg tttcatacta      300
ttaatcatat gtttggcaac cctgtcatat cttttaagga tggtatattt tttgctgcca      360
cagagaaaatc aaatgttgtc cgtgggtggg tttttggttc taccatgaac aacaagtcac      420
agtcggtgat tattattaac aattctacta atgttggttat acgagcatgt aactttgaat      480
tgtgtgacaa ccctttcttt gctgtttcta aacccatggg tacacagaca catactatga      540
tattcgataa tgcatttaat tgcactttcg agtacatatc tgatgccttt tcgcttgatg      600
tttcagaaaa gtcaggtaat tttaaacact tacgagagtt tgtgtttaaa aataaagatg      660
ggtttctcta tgtttataag ggctatcaac ctatagatgt agttcgtgat ctaccttctg      720
gttttaacac tttgaaacct atttttaagt tgcctcttgg tattaacatt acaaatttta      780
gagccattct tacagccttt tcacctgctc aagacatttg gggcacgtca gctgcagcct      840
attttgttgg ctatttaaag ccaactacat ttatgctcaa gtatgatgaa aatggtacaa      900
tcacagatgc tgttgattgt tctcaaaatc cacttgctga actcaaatgc tctgttaaga      960
gctttgagat tgacaaagga atttaccaga cctctaattt cagggttgtt ccctcaggag     1020
atgttgtgag attccctaatt attacaaact tgtgtccttt tggagagggt tttaatgcta     1080
ctaaattccc ttctgtctat gcatgggaga gaaaaaaaaat ttctaattgt gttgctgatt     1140
actctgtgct ctacaactca acattttttt caacctttta gtgctatggc gtttctgcca     1200
ctaagttgaa tgatctttgc ttctccaatg tctatgcaga ttcttttgta gtcaagggag     1260
atgatgtaag acaaatagcg ccaggacaaa ctggtgttat tgctgattat aattataaat     1320
tgccagatga tttcatgggt tgtgtccttg cttggaatac taggaacatt gatgctactt     1380
caactggtaa ttataattat aaatataggt atcttagaca tggcaagctt aggccctttg     1440
agagagacat atctaattgt cttttctccc ctgatggcaa accttgacc ccacctgctc     1500
ttaattgtta ttggccatta aatgattatg gtttttacac cactactggc attggctacc     1560
aaccttacag agttgtagta ctttcttttg aactttttaa tgcaccggcc acggtttgtg     1620
gaccaaatt atccactgac cttattaaga accagtgtgt caattttaat tttaatggac     1680
tcactggtac tgggtgtgta actccttctt caaagagatt tcaaccattt caacaatttg     1740
gccgtgatgt ctctgatttc actgattccg ttcgagatcc taaaacatct gaaatattag     1800

```

S226CAS111.ST25

acatttcacc ttgctctttt gggggtgtaa gtgtaattac acctggaaca aatgcttcat	1860
ctgaagttgc tgttctatat caagatgtta actgcactga tgtttctaca gcaatccatg	1920
cagatcaact cacaccagct tggcgcatat attctactgg aaacaatgta ttccagactc	1980
aagcaggctg tcttatagga gctgagcatg tcgacacttc ttatgagtgc gacattccta	2040
ttggagctg	2049

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 2027

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 6	
catgcagatc aactcacacc agcttggcgc atatattcta ctggaaacaa tgtattccag	60
actcaagcag gctgtcttat aggagctgag catgtcgaca cttcttatga gtgcgacatt	120
cctattggag ctggcatttg tgctagttac catacagttt ctttattacg tagtactagc	180
caaaaatcta ttgtggctta tactatgtct ttaggtgctg atagttcaat tgcttactct	240
aataacacca ttgctatacc tactaacttt tcaattagca ttactacaga agtaatgcct	300
gtttctatgg ctaaaacctc cgtagattgt aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa	360
tgtgctaatt tgcttctcca atatggtagc ttttgcacac aactaaatcg tgcactctca	420
ggtattgctg ctgaacagga tcgcaacaca cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaatg	480
tacaaaaccc caactttgaa atattttggt ggttttaatt tttcacaat attacctgac	540
cctctaaagc caactaagag gtcttttatt gaggacttgc tctttaataa ggtgacactc	600
gctgatgctg gcttcatgaa gcaatatggc gaatgcctag gtgatattaa tgctagagat	660
ctcatttgctg cgcagaagtt caatgggctt acagtgttgc cacctctgct cactgatgat	720
atgattgctg cctacactgc tgctctagtt agtggtagt ccactgctgg atggacattt	780
ggtgctggcg ctgctcttca aatacctttt gctatgcaaa tggcatatag gttcaatggc	840
attggagtta cccaaaatgt tctctatgag aacaaaaaac aaatcgcaa ccaatttaac	900
aaggcgatta gtcaaattca agaatacatt acaacaacat caactgcatt gggcaagctg	960
caagacgttg ttaaccagaa tgctcaagca ttaaacaacac ttgttaaaca acttagctct	1020
aattttggtg caatttcaag tgtgctaaat gatatccttt cgcgacttga taaagtcgag	1080
gcggaggtac aaattgacag gttaattaca ggcagacttc aaagccttca aacctatgta	1140
acacaacaac taatcagggc tgctgaaatc agggcttctg ctaatcttgc tgctactaaa	1200
atgtctgagt gtgttcttgg acaatcaaaa agagttgact tttgtggaaa gggctaccac	1260
cttatgtcct tcccacaagc agccccgcat ggtgttgtct tcctacatgt cacgtatgtg	1320
ccatcccagg agaggaactt caccacagcg ccagcaattt gtcatgaagg caaagcatac	1380



S226CAS111.ST25

ttccctcgtg	aaggtgtttt	tgtgtttaat	ggcacttctt	ggtttattac	acagaggaac	1440
ttcttttctc	cacaaataat	tactacagac	aatacatttg	tctcaggaaa	ttgtgatgtc	1500
gttattggcg	tcattaacaa	cacagtttat	gacacctctg	aacctgagct	tgactcattc	1560
aaagaagagc	tggacaagta	cttcaaaaat	catacatcac	cagatgttga	tcttggcgac	1620
atttcaggca	ttaacgcttc	tgtcgtcaac	attcaaaaag	aaattgaccg	cctcaatgag	1680
gtcgcataaa	atttaaatga	atcactcatt	gaccttcaag	aattgggaaa	atatgagcaa	1740
tatattaaat	ggccttggtg	tgtttggctc	ggcttcattg	ctggactaat	tgccatcgtc	1800
atggttacaa	tcttgctttg	ttgcatgact	agttgttgca	gttgacctca	gggtgcatgc	1860
tcttgtggtt	cttgctgcaa	gtttgatgag	gatgactctg	agccagttct	caaggggtgc	1920
aaattacatt	acacataaac	gaacttatgg	atttgtttat	gagatTTTTT	actcttggat	1980
caattactgc	acagccagta	aaaattgaca	atgcttctcc	tgcaagt		2027

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1096

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 7

tcttgctttg	ttgcatgact	agttgttgca	gttgacctca	gggtgcatgc	tcttgtggtt	60
cttgctgcaa	gtttgatgag	gatgactctg	agccagttct	caaggggtgc	aaattacatt	120
acacataaac	gaacttatgg	atttgtttat	gagatTTTTT	actcttggat	caattactgc	180
acagccagta	aaaattgaca	atgcttctcc	tgcaagtact	gttcatgcta	cagcaacgat	240
accgctacaa	gcctcactcc	ctttcggtatg	gcttgttatt	ggcgttgcat	ttcttgctgt	300
ttttcagagc	gctacaaaa	taattgctg	caataaaaga	tggcagctag	ccctttataa	360
gggcttccag	ttcatttgca	atttactgct	gctatttggt	accatctatt	cacatctttt	420
gcttgtcgct	gcaggtatgg	aggcgcaatt	ttgtacctc	tatgccttga	tatattttct	480
acaatgcac	aacgcatgta	gaattattat	gagatgttgg	ctttgttgga	agtgcaaadc	540
caagaacca	ttactttatg	atgccaacta	ctttgtttgc	tggcacacac	ataactatga	600
ctactgtata	ccatataaca	gtgtcacaga	tacaattgtc	gttactgaag	gtgacggcat	660
ttcaacacca	aaactcaaag	aagactacca	aattgggtgg	tattctgagg	ataggcactc	720
aggtgttaaa	gactatgtcg	ttgtacatgg	ctatttcacc	gaagtttact	accagcttga	780
gtctacacaa	attactacag	acactgggtat	tgaaaatgct	acattcttca	tctttaacaa	840
gcttgttaaa	gacccaccga	atgtgcaaat	acacacaadc	gacggctctt	caggagtgtc	900
taatccagca	atggatccaa	tttatgatga	gccgacgacg	actactagcg	tgcccttgta	960
agcacaagaa	agtgagtacg	aacttatgta	ctcattcggt	tcggaagaaa	cagggtacgtt	1020

S226CAS111.ST25

aatagttaat agcgtacttc tttttcttgc tttcgtggta ttcttgctag tcacactagc 1080  
 catccttact gcgctt 1096

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1135

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 8

attgccatcg tcatggttac aatcttgctt tgttgcata ctagttgttg cagttgcctc 60  
 aagggtgcat gctcttgctg ttcttgctgc aagtttgatg aggatgactc tgagccagtt 120  
 ctcaaggggtg tcaaattaca ttacacataa acgaacttat ggatttggtt atgagatttt 180  
 ttactcttggt atcaattact gcacagccag taaaaattga caatgcttct cctgcaagta 240  
 ctgttcatgc tacagcaacg ataccgctac aagcctcact ccctttcgga tggcttggtta 300  
 ttggcggttg atttcttgct gtttttcaga gcgctaccaa aataattgcg ctcaataaaa 360  
 gatggcagct agccctttat aagggtctcc agttcatttg caatttactg ctgctatttg 420  
 ttaccatcta ttcacatctt ttgcttgctg ctgcaggtat ggaggcgcaa tttttgtacc 480  
 tctatgcctt gatataattt ctacaatgca tcaacgcatg tagaattatt atgagatgtt 540  
 ggctttgttg gaagtgcaaa tccaagaacc cttacttta tgatgccaac tactttgttt 600  
 gctggcacac acataactat gactactgta taccatataa cagtgtcaca gatacaattg 660  
 tcgttactga aggtgacggc atttcaacac caaaactcaa agaagactac caaattggtg 720  
 gttattctga ggataggcac tcaggtgtta aagactatgt cgttgatcat ggctatttca 780  
 ccgaagttaa ctaccagctt gagtctacac aaattactac agacactggt attgaaaatg 840  
 ctacattctt catctttaac aagcttggtta aagaccacc gaatgtgcaa atacacacaa 900  
 tcgacggctc ttcaggagtt gctaattccag caatggatcc aatttatgat gagccgacga 960  
 cgactactag cgtgcctttg taagcacaag aaagttagta cgaacttatg tactcattcg 1020  
 tttcgaaga aacaggtagc ttaatagtta atagcgtagt tctttttctt gctttcgtgg 1080  
 tattcttgct agtcacacta gccatcctta ctgcgcttcg attgtgtgcg tactg 1135

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1096

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

S226CAS111.ST25

&lt;222&gt; (137)..(958)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 9

tcttgctttg ttgcatgact agttgttgca gttgcctcaa ggggtgcatgc tcttgtgggt	60
cttgctgcaa gtttgatgag gatgactctg agccagttct caagggtgtc aaattacatt	120
acacataaac gaactt atg gat ttg ttt atg aga ttt ttt act ctt gga tca	172
Met Asp Leu Phe Met Arg Phe Phe Thr Leu Gly Ser	
1 5 10	
att act gca cag cca gta aaa att gac aat gct tct cct gca agt act	220
Ile Thr Ala Gln Pro Val Lys Ile Asp Asn Ala Ser Pro Ala Ser Thr	
15 20 25	
gtt cat gct aca gca acg ata ccg cta caa gcc tca ctc cct ttc gga	268
Val His Ala Thr Ala Thr Ile Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Phe Gly	
30 35 40	
tgg ctt gtt att ggc gtt gca ttt ctt gct gtt ttt cag agc gct acc	316
Trp Leu Val Ile Gly Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Gln Ser Ala Thr	
45 50 55 60	
aaa ata att gcg ctc aat aaa aga tgg cag cta gcc ctt tat aag ggc	364
Lys Ile Ile Ala Leu Asn Lys Arg Trp Gln Leu Ala Leu Tyr Lys Gly	
65 70 75	
ttc cag ttc att tgc aat tta ctg ctg cta ttt gtt acc atc tat tca	412
Phe Gln Phe Ile Cys Asn Leu Leu Leu Leu Phe Val Thr Ile Tyr Ser	
80 85 90	
cat ctt ttg ctt gtc gct gca ggt atg gag gcg caa ttt ttg tac ctc	460
His Leu Leu Val Ala Ala Gly Met Glu Ala Gln Phe Leu Tyr Leu	
95 100 105	
tat gcc ttg ata tat ttt cta caa tgc atc aac gca tgt aga att att	508
Tyr Ala Leu Ile Tyr Phe Leu Gln Cys Ile Asn Ala Cys Arg Ile Ile	
110 115 120	
atg aga tgt tgg ctt tgt tgg aag tgc aaa tcc aag aac cca tta ctt	556
Met Arg Cys Trp Leu Cys Trp Lys Cys Lys Ser Lys Asn Pro Leu Leu	
125 130 135 140	
tat gat gcc aac tac ttt gtt tgc tgg cac aca cat aac tat gac tac	604
Tyr Asp Ala Asn Tyr Phe Val Cys Trp His Thr His Asn Tyr Asp Tyr	
145 150 155	
tgt ata cca tat aac agt gtc aca gat aca att gtc gtt act gaa ggt	652
Cys Ile Pro Tyr Asn Ser Val Thr Asp Thr Ile Val Val Thr Glu Gly	
160 165 170	
gac ggc att tca aca cca aaa ctc aaa gaa gac tac caa att ggt ggt	700
Asp Gly Ile Ser Thr Pro Lys Leu Lys Glu Asp Tyr Gln Ile Gly Gly	
175 180 185	
tat tct gag gat agg cac tca ggt gtt aaa gac tat gtc gtt gta cat	748
Tyr Ser Glu Asp Arg His Ser Gly Val Lys Asp Tyr Val Val Val His	
190 195 200	
ggc tat ttc acc gaa gtt tac tac cag ctt gag tct aca caa att act	796
Gly Tyr Phe Thr Glu Val Tyr Tyr Gln Leu Glu Ser Thr Gln Ile Thr	
205 210 215 220	

S226CAS111.ST25

aca gac act ggt att gaa aat gct aca ttc ttc atc ttt aac aag ctt	844
Thr Asp Thr Gly Ile Glu Asn Ala Thr Phe Phe Ile Phe Asn Lys Leu	
225 230 235	
gtt aaa gac cca ccg aat gtg caa ata cac aca atc gac ggc tct tca	892
Val Lys Asp Pro Pro Asn Val Gln Ile His Thr Ile Asp Gly Ser Ser	
240 245 250	
gga gtt gct aat cca gca atg gat cca att tat gat gag ccg acg acg	940
Gly Val Ala Asn Pro Ala Met Asp Pro Ile Tyr Asp Glu Pro Thr Thr	
255 260 265	
act act agc gtg cct ttg taagcacaag aaagtgagta cgaacttatg	988
Thr Thr Ser Val Pro Leu	
270	
tactcattcg tttcggaaga aacaggtagc ttaatagtta atagcgtact tcttttttctt	1048
gctttcgtgg tattcttgct agtcacacta gccatcctta ctgcgctt	1096

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 10

Met Asp Leu Phe Met Arg Phe Phe Thr Leu Gly Ser Ile Thr Ala Gln
1 5 10 15

Pro Val Lys Ile Asp Asn Ala Ser Pro Ala Ser Thr Val His Ala Thr
20 25 30

Ala Thr Ile Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Phe Gly Trp Leu Val Ile
35 40 45

Gly Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Gln Ser Ala Thr Lys Ile Ile Ala
50 55 60

Leu Asn Lys Arg Trp Gln Leu Ala Leu Tyr Lys Gly Phe Gln Phe Ile
65 70 75 80

Cys Asn Leu Leu Leu Leu Phe Val Thr Ile Tyr Ser His Leu Leu Leu
85 90 95

Val Ala Ala Gly Met Glu Ala Gln Phe Leu Tyr Leu Tyr Ala Leu Ile
100 105 110

Tyr Phe Leu Gln Cys Ile Asn Ala Cys Arg Ile Ile Met Arg Cys Trp
115 120 125

Leu Cys Trp Lys Cys Lys Ser Lys Asn Pro Leu Leu Tyr Asp Ala Asn
130 135 140

## S226CAS111.ST25

Tyr Phe Val Cys Trp His Thr His Asn Tyr Asp Tyr Cys Ile Pro Tyr  
 145 150 155 160

Asn Ser Val Thr Asp Thr Ile Val Val Thr Glu Gly Asp Gly Ile Ser  
 165 170 175

Thr Pro Lys Leu Lys Glu Asp Tyr Gln Ile Gly Gly Tyr Ser Glu Asp  
 180 185 190

Arg His Ser Gly Val Lys Asp Tyr Val Val Val His Gly Tyr Phe Thr  
 195 200 205

Glu Val Tyr Tyr Gln Leu Glu Ser Thr Gln Ile Thr Thr Asp Thr Gly  
 210 215 220

Ile Glu Asn Ala Thr Phe Phe Ile Phe Asn Lys Leu Val Lys Asp Pro  
 225 230 235 240

Pro Asn Val Gln Ile His Thr Ile Asp Gly Ser Ser Gly Val Ala Asn  
 245 250 255

Pro Ala Met Asp Pro Ile Tyr Asp Glu Pro Thr Thr Thr Thr Ser Val  
 260 265 270

Pro Leu

<210> 11

<211> 1096

<212> DNA

<213> CORONAVIRUS

<220>

<221> CDS

<222> (558)..(1019)

<223>

<400> 11  
 tcttgctttg ttgcatgact agttgttgca gttgcctcaa ggggtgcatgc tcttggtggtt 60  
 cttgctgcaa gtttgatgag gatgactctg agccagttct caaggggtgc aaattacatt 120  
 acacataaac gaacttatgg atttgtttat gagatttttt actcttggat caattactgc 180  
 acagccagta aaaattgaca atgcttctcc tgcaagtact gttcatgcta cagcaacgat 240  
 accgctacaa gcctcactcc ctttcggatg gcttggttatt ggcgttgcat ttcttgctgt 300

S226CAS111.ST25

```

ttttcagagc gctacaaaa taattgcgct caataaaaga tggcagctag ccctttataa 360
gggcttccag ttcatttgca atttactgct gctatttggt accatctatt cacatctttt 420
gcttgctcgct gcaggatatgg aggcgcaatt tttgtacctc tatgccttga tatattttct 480
acaatgcatc aacgcatgta gaattattat gagatgttgg ctttgttgga agtgcaaatc 540
caagaacca ttacttt atg atg cca act act ttg ttt gct ggc aca cac 590
                Met Met Pro Thr Thr Leu Phe Ala Gly Thr His
                1                    5                    10

ata act atg act act gta tac cat ata aca gtg tca cag ata caa ttg 638
Ile Thr Met Thr Thr Val Tyr His Ile Thr Val Ser Gln Ile Gln Leu
                15                    20                    25

tcg tta ctg aag gtg acg gca ttt caa cac caa aac tca aag aag act 686
Ser Leu Leu Lys Val Thr Ala Phe Gln His Gln Asn Ser Lys Lys Thr
                30                    35                    40

acc aaa ttg gtg gtt att ctg agg ata ggc act cag gtg tta aag act 734
Thr Lys Leu Val Val Ile Leu Arg Ile Gly Thr Gln Val Leu Lys Thr
                45                    50                    55

atg tcg ttg tac atg gct att tca ccg aag ttt act acc agc ttg agt 782
Met Ser Leu Tyr Met Ala Ile Ser Pro Lys Phe Thr Thr Ser Leu Ser
60                                65                                70                                75

cta cac aaa tta cta cag aca ctg gta ttg aaa atg cta cat tct tca 830
Leu His Lys Leu Leu Gln Thr Leu Val Leu Lys Met Leu His Ser Ser
80                                85                                90

tct tta aca agc ttg tta aag acc cac cga atg tgc aaa tac aca caa 878
Ser Leu Thr Ser Leu Leu Lys Thr His Arg Met Cys Lys Tyr Thr Gln
95                                100                                105

tcg acg gct ctt cag gag ttg cta atc cag caa tgg atc caa ttt atg 926
Ser Thr Ala Leu Gln Glu Leu Leu Ile Gln Gln Trp Ile Gln Phe Met
110                    115                    120

atg agc cga cga cga cta cta gcg tgc ctt tgt aag cac aag aaa gtg 974
Met Ser Arg Arg Arg Leu Leu Ala Cys Leu Cys Lys His Lys Lys Val
125                    130                    135

agt acg aac tta tgt act cat tcg ttt cgg aag aaa cag gta cgt 1019
Ser Thr Asn Leu Cys Thr His Ser Phe Arg Lys Lys Gln Val Arg
140                    145                    150

taatagttaa tagcgctactt ctttttcttg ctttcgtggg attcttgcta gtcacactag 1079
ccatccttac tgcgctt 1096

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 154

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 12

```

Met Met Pro Thr Thr Leu Phe Ala Gly Thr His Ile Thr Met Thr Thr
1                    5                    10                    15

```

S226CAS111.ST25

Val Tyr His Ile Thr Val Ser Gln Ile Gln Leu Ser Leu Leu Lys Val  
 20 25 30

Thr Ala Phe Gln His Gln Asn Ser Lys Lys Thr Thr Lys Leu Val Val  
 35 40 45

Ile Leu Arg Ile Gly Thr Gln Val Leu Lys Thr Met Ser Leu Tyr Met  
 50 55 60

Ala Ile Ser Pro Lys Phe Thr Thr Ser Leu Ser Leu His Lys Leu Leu  
 65 70 75 80

Gln Thr Leu Val Leu Lys Met Leu His Ser Ser Ser Leu Thr Ser Leu  
 85 90 95

Leu Lys Thr His Arg Met Cys Lys Tyr Thr Gln Ser Thr Ala Leu Gln  
 100 105 110

Glu Leu Leu Ile Gln Gln Trp Ile Gln Phe Met Met Ser Arg Arg Arg  
 115 120 125

Leu Leu Ala Cys Leu Cys Lys His Lys Lys Val Ser Thr Asn Leu Cys  
 130 135 140

Thr His Ser Phe Arg Lys Lys Gln Val Arg  
 145 150

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 332

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (36)..(263)

&lt;223&gt;

<400> 13  
 tgcctttgta agcacaagaa agtgagtacg aactt atg tac tca ttc gtt tcg 53  
 Met Tyr Ser Phe Val Ser  
 1 5

gaa gaa aca ggt acg tta ata gtt aat agc gta ctt ctt ttt ctt gct 101  
 Glu Glu Thr Gly Thr Leu Ile Val Asn Ser Val Leu Leu Phe Leu Ala  
 10 15 20

ttc gtg gta ttc ttg cta gtc aca cta gcc atc ctt act gcg ctt cga 149  
 Phe Val Val Phe Leu Leu Val Thr Leu Ala Ile Leu Thr Ala Leu Arg

S226CAS111.ST25

25	30	35	
ttg tgt gcg tac tgc tgc aat att gtt aac gtg agt tta gta aaa cca			197
Leu Cys Ala Tyr Cys Cys Asn Ile Val Asn Val Ser Leu Val Lys Pro			
40	45	50	
acg gtt tac gtc tac tcg cgt gtt aaa aat ctg aac tct tct gaa gga			245
Thr Val Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn Leu Asn Ser Ser Glu Gly			
55	60	65	70
gtt cct gat ctt ctg gtc taaacgaact aactattatt attattctgt			293
Val Pro Asp Leu Leu Val			
75			
ttggaacttt aacattgctt atcatggcag acaacggtg			332

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 76

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 14

Met Tyr Ser Phe Val Ser Glu Glu Thr Gly Thr Leu Ile Val Asn Ser	
1 5 10 15	
Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Val Val Phe Leu Leu Val Thr Leu Ala	
20 25 30	
Ile Leu Thr Ala Leu Arg Leu Cys Ala Tyr Cys Cys Asn Ile Val Asn	
35 40 45	
Val Ser Leu Val Lys Pro Thr Val Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn	
50 55 60	
Leu Asn Ser Ser Glu Gly Val Pro Asp Leu Leu Val	
65 70 75	

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 332

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 15	
tgcctttgta agcacaagaa agtgagtacg aacttatgta ctcatcgtt tcggaagaaa	60
caggtacgtt aatagttaat agcgtacttc tttttcttgc tttcgtggta ttcttgctag	120
tcacactagc catccttact gcgcttcgat tgtgtgcgta ctgctgcaat attgttaacg	180
tgagtttagt aaaaccaacg gtttacgtct actcgcgtgt taaaaatctg aactcttctg	240



S226CAS111.ST25

aaggagttcc tgatcttctg gtctaaacga actaactatt attattattc tgtttggaac 300  
 ttttaacattg cttatcatgg cagacaacgg ta 332

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 708

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (41)..(703)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 16

tattattatt attctgtttg gaactttaac attgcttatc atg gca gac aac ggt 55  
 Met Ala Asp Asn Gly  
 1 5

act att acc gtt gag gag ctt aaa caa ctc ctg gaa caa tgg aac cta 103  
 Thr Ile Thr Val Glu Glu Leu Lys Gln Leu Leu Glu Gln Trp Asn Leu  
 10 15 20

gta ata ggt ttc cta ttc cta gcc tgg att atg tta cta caa ttt gcc 151  
 Val Ile Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Ile Met Leu Leu Gln Phe Ala  
 25 30 35

tat tct aat cgg aac agg ttt ttg tac ata ata aag ctt gtt ttc ctc 199  
 Tyr Ser Asn Arg Asn Arg Phe Leu Tyr Ile Ile Lys Leu Val Phe Leu  
 40 45 50

tgg ctc ttg tgg cca gta aca ctt gct tgt ttt gtg ctt gct gct gtc 247  
 Trp Leu Leu Trp Pro Val Thr Leu Ala Cys Phe Val Leu Ala Ala Val  
 55 60 65

tac aga att aat tgg gtg act ggc ggg att gcg att gca atg gct tgt 295  
 Tyr Arg Ile Asn Trp Val Thr Gly Gly Ile Ala Ile Ala Met Ala Cys  
 70 75 80 85

att gta ggc ttg atg tgg ctt agc tac ttc gtt gct tcc ttc agg ctg 343  
 Ile Val Gly Leu Met Trp Leu Ser Tyr Phe Val Ala Ser Phe Arg Leu  
 90 95 100

ttt gct cgt acc cgc tca atg tgg tca ttc aac cca gaa aca aac att 391  
 Phe Ala Arg Thr Arg Ser Met Trp Ser Phe Asn Pro Glu Thr Asn Ile  
 105 110 115

ctt ctc aat gtg cct ctc cgg ggg aca att gtg acc aga ccg ctc atg 439  
 Leu Leu Asn Val Pro Leu Arg Gly Thr Ile Val Thr Arg Pro Leu Met  
 120 125 130

gaa agt gaa ctt gtc att ggt gct gtg atc att cgt ggt cac ttg cga 487  
 Glu Ser Glu Leu Val Ile Gly Ala Val Ile Ile Arg Gly His Leu Arg  
 135 140 145

atg gcc gga cac tcc cta ggg cgc tgt gac att aag gac ctg cca aaa 535  
 Met Ala Gly His Ser Leu Gly Arg Cys Asp Ile Lys Asp Leu Pro Lys

S226CAS111.ST25

150	155	160	165	
gag atc act gtg gct aca tca cga acg ctt tct tat tac aaa tta gga				583
Glu Ile Thr Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu Ser Tyr Tyr Lys Leu Gly				
	170	175	180	
gcg tcg cag cgt gta ggc act gat tca ggt ttt gct gca tac aac cgc				631
Ala Ser Gln Arg Val Gly Thr Asp Ser Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Arg				
	185	190	195	
tac cgt att gga aac tat aaa tta aat aca gac cac gcc ggt agc aac				679
Tyr Arg Ile Gly Asn Tyr Lys Leu Asn Thr Asp His Ala Gly Ser Asn				
	200	205	210	
gac aat att gct ttg cta gta cag taagt				708
Asp Asn Ile Ala Leu Leu Val Gln				
	215	220		

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 221

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 17

Met Ala Asp Asn Gly Thr Ile Thr Val Glu Glu Leu Lys Gln Leu Leu  
1 5 10 15

Glu Gln Trp Asn Leu Val Ile Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Ile Met  
20 25 30

Leu Leu Gln Phe Ala Tyr Ser Asn Arg Asn Arg Phe Leu Tyr Ile Ile  
35 40 45

Lys Leu Val Phe Leu Trp Leu Leu Trp Pro Val Thr Leu Ala Cys Phe  
50 55 60

Val Leu Ala Ala Val Tyr Arg Ile Asn Trp Val Thr Gly Gly Ile Ala  
65 70 75 80

Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Gly Leu Met Trp Leu Ser Tyr Phe Val  
85 90 95

Ala Ser Phe Arg Leu Phe Ala Arg Thr Arg Ser Met Trp Ser Phe Asn  
100 105 110

Pro Glu Thr Asn Ile Leu Leu Asn Val Pro Leu Arg Gly Thr Ile Val  
115 120 125

Thr Arg Pro Leu Met Glu Ser Glu Leu Val Ile Gly Ala Val Ile Ile  
130 135 140

Arg Gly His Leu Arg Met Ala Gly His Ser Leu Gly Arg Cys Asp Ile

S226CAS111.ST25

145                      150                      155                      160

Lys Asp Leu Pro Lys Glu Ile Thr Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu Ser  
                          165                      170                      175

Tyr Tyr Lys Leu Gly Ala Ser Gln Arg Val Gly Thr Asp Ser Gly Phe  
                          180                      185                      190

Ala Ala Tyr Asn Arg Tyr Arg Ile Gly Asn Tyr Lys Leu Asn Thr Asp  
                          195                      200                      205

His Ala Gly Ser Asn Asp Asn Ile Ala Leu Leu Val Gln  
                          210                      215                      220

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 769

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 18  
 cctgatcttc tgggtctaaac gaactaacta ttattattat tctgtttgga actttaacat 60  
 tgcttatcat ggcagacaac ggtactatta ccgttgagga gcttaaaca ctcctggaac 120  
 aatggaacct agtaataggt ttcctattcc tagcctggat tatgttacta caatttgcct 180  
 attctaatacg gaacagggtt ttgtacataa taaagcttgt tttcctctgg ctcttggtggc 240  
 cagtaacact tgcttggttt gtgcttgctg ctgtctacag aattaattgg gtgactggcg 300  
 ggattgcatg tgcaatggct tgtattgtag gcttgatgtg gcttagctac ttcgttgctt 360  
 ccttcagggt gtttgctcgt acccgctcaa tgtggtcatt caaccagaa acaaacattc 420  
 ttctcaatgt gcctctccgg gggacaattg tgaccagacc gctcatggaa agtgaacttg 480  
 tcattggtgc tgtgatcatt cgtgggtcact tgcgaatggc cggacactcc ctaggggcgt 540  
 gtgacattaa ggacctgcca aaagagatca ctgtggctac atcacgaacg ctttcttatt 600  
 acaaattagg agcgtcgcag cgtgtaggca ctgattcagg ttttgctgca tacaaccgct 660  
 accgtattgg aaactataaa ttaaatacag accacgccgg tagcaacgac aatattgctt 720  
 tgctagtaca gtaagtgaca acagatgttt catcttggtg acttccagg 769

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1231

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 19

S226CAS111.ST25

taccgtattg gaaactataa attaaataca gaccacgccg gtagcaacga caatattgct	60
ttgctagtag agtaagtgaac aacagatggt tcatcttggt gacttccagg ttacaatagc	120
agagatatgg attatcatta tgaggacttt caggattgct atttggaatc ttgacgttat	180
aataagttca atagtgaagac aattatttaa gcctctaact aagaagaatt attcggaggt	240
agatgatgaa gaacctatgg agttagatta tccataaaac gaacatgaaa attattctct	300
tcctgacatt gattgtattt acatcttgcg agctatatca ctatcaggag tgtgttagag	360
gtacgactgt actactaaaa gaaccttgcc catcaggaac atacgagggc aattcaccat	420
ttcacctctt tgctgacaat aaatttgcac taacttgcac tagcacacac tttgcttttg	480
cttgtgctga cggtagctga catacctatc agctgcgtgc aagatcagtt tcacaaaaac	540
ttttcatcag acaagaggag gttcaacaag agctctactc gccacttttt ctcatgtgtg	600
ctgctctagt atttttaata ctttgcttca ccattaagag aaagacagaa tgaatgagct	660
cactttaatt gacttctatt tgtgcttttt agcctttctg ctattccttg ttttaataat	720
gcttattata ttttggtttt cactcgaaat ccaggatcta gaagaacctt gtaccaaagt	780
ctaaacgaac atgaaacttc tcattgtttt gacttgtatt tctctatgca gttgcatatg	840
cactgtagta cagcgctgtg catctaataa acctcatgtg cttgaagatc cttgtaaggt	900
acaacactag gggtaatact tatagcactg cttggctttg tgctctagga aagggttttac	960
cttttcatag atggcacact atggttcaaa catgcacacc taatgttact atcaactgtc	1020
aagatccagc tgggtggtgcg cttatagcta ggtgttggtta ctttcatgaa ggtcacaaa	1080
ctgctgcatt tagagacgta cttgttggtt taaataaacg aacaaattaa aatgtctgat	1140
aatggacccc aatcaaacca acgtagtgcc ccccgcatca catttggtgg acccacagat	1200
tcaactgaca ataaccagaa tggaggacgc a	1231

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 1242

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 20

gcatacaacc gctaccgtat tggaaactat aaattaaata cagaccacgc cggtagcaac	60
gacaatattg ctttgctagt acagtaagtg acaacagatg tttcatcttg ttgacttcca	120
ggttacaata gcagagatat tgattatcat tatgaggact ttcaggattg ctatttgga	180
tcttgacgtt ataataagtt caatagtgaac acagttattt aagcctctaa ctaagaagaa	240
ttattcggag ttagatgatg aagaacctat ggagttagat tatccataaa acgaacatga	300
aaattattct cttcctgaca ttgattgtat ttacatcttg cgagctatat cactatcagg	360
agtgtgttag aggtacgact gtactactaa aagaaccttg cccatcagga acatacagg	420

## S226CAS111.ST25

```

gcaattcacc atttcaccct cttgctgaca ataaatttgc actaacttgc actagcacac 480
acttttgcttt tgcttgtgct gacggtactc gacataccta tcagctgcgt gcaagatcag 540
tttcaccaaaa actttttcatc agacaagagg aggttcaaca agagctctac tcgccacttt 600
ttctcattgt tgctgctcta gtatttttaa tacttttgctt caccattaag agaaagacag 660
aatgaatgag ctacttttaa ttgacttcta tttgtgcttt ttagcctttc tgctattcct 720
tgttttaata atgcttatta tattttgggtt ttcactcgaa atccaggatc tagaagaacc 780
ttgtaccaaa gtctaaacga acatgaaact tctcattgtt ttgacttgta tttctctatg 840
cagttgcata tgcaactgtag tacagcgctg tgcactaat aaacctcatg tgcttgaaga 900
tccttgtaag gtacaacact aggggtaata cttatagcac tgcttggtt tgtgctctag 960
gaaagggtttt accttttcat agatggcaca ctatggttca aacatgcaca cctaattgta 1020
ctatcaactg tcaagatcca gctgggtggtg cgcttatagc taggtggttg taccttcatg 1080
aagggtcacca aactgctgca tttagagacg tacttggtgt tttaaataaa cgaacgaatt 1140
aaaatgtctg ataatggacc ccaatcaaac caacgtagtg ccccccgcac tacatttggt 1200
ggacccacag attcaactga caataaccag aatggaggac gc 1242

```

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 1231

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (86)..(274)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 21

```

taccgtattg gaaactataa attaaataca gaccacgccg gtagcaacga caatattgct 60
ttgctagtac agtaagtgc aacag atg ttt cat ctt gtt gac ttc cag gtt 112
                               Met Phe His Leu Val Asp Phe Gln Val
                               1 5
aca ata gca gag ata ttg att atc att atg agg act ttc agg att gct 160
Thr Ile Ala Glu Ile Leu Ile Ile Ile Met Arg Thr Phe Arg Ile Ala
10 15 20 25
att tgg aat ctt gac gtt ata ata agt tca ata gtg aga caa tta ttt 208
Ile Trp Asn Leu Asp Val Ile Ile Ser Ser Ile Val Arg Gln Leu Phe
30 35 40
aag cct cta act aag aag aat tat tgc gag tta gat gat gaa gaa cct 256
Lys Pro Leu Thr Lys Lys Asn Tyr Ser Glu Leu Asp Asp Glu Glu Pro
45 50 55

```

S226CAS111.ST25

atg gag tta gat tat cca taaaacgaac atgaaaatta ttctcttcct 304  
 Met Glu Leu Asp Tyr Pro  
 60

gacattgatt gtattttacat cttgcgagct atatcactat caggagtgtg ttagaggtag 364  
 gactgtacta ctaaaagaac cttgcccatac aggaacatac gagggcaatt caccatttca 424  
 cccctcttgct gacaataaat ttgcactaac ttgcactagc acacactttg cttttgcttg 484  
 tgctgacggc actcgacata cctatcagct gcgtgcaaga tcagtttcac caaaactttt 544  
 catcagacaa gaggagggtc aacaagagct ctactcgcca ctttttctca ttgttgctgc 604  
 tctagtattt ttaatacttt gcttcacat taagagaaag acagaatgaa tgagctcact 664  
 ttaattgact tctattttgtg ctttttagcc tttctgctat tccttggttt aataatgctt 724  
 attatatttt ggtttttact cgaaatccag gatctagaag aaccttgtag caaagtctaa 784  
 acgaacatga aacttctcat tgttttgact tgtattttctc tatgcagttg catatgcact 844  
 gtagtacagc gctgtgcatc taataaacct catgtgcttg aagatccttg taaggtagaa 904  
 cactaggggt aatacttata gcactgcttg gctttgtgct ctaggaaagg ttttaccttt 964  
 tcatagatgg cacactatgg ttcaaactg cacacctaata gttactatca actgtcaaga 1024  
 tccagctggc ggtgcgctta tagctaggtg ttggtacctt catgaaggct accaaactgc 1084  
 tgcatttaga gacgtacttg ttgttttaaa taaacgaaca aattaaaatg tctgataatg 1144  
 gacccaatc aaaccaacgt agtgccccc gcattacatt tggtggaccc acagattcaa 1204  
 ctgacaataa ccagaatgga ggacgca 1231

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 22

Met Phe His Leu Val Asp Phe Gln Val Thr Ile Ala Glu Ile Leu Ile  
 1 5 10 15

Ile Ile Met Arg Thr Phe Arg Ile Ala Ile Trp Asn Leu Asp Val Ile  
 20 25 30

Ile Ser Ser Ile Val Arg Gln Leu Phe Lys Pro Leu Thr Lys Lys Asn  
 35 40 45

Tyr Ser Glu Leu Asp Asp Glu Glu Pro Met Glu Leu Asp Tyr Pro  
 50 55 60

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 1231

S226CAS111.ST25

<212> DNA

<213> CORONAVIRUS

**<220>**

<221> CDS

<222> (285) .. (650)

<223>

[illegible]

ctc ttc ctg aca ttg att gta ttt aca tct tgc gag cta tat cac tat 344  
Leu Phe Leu Thr Leu Ile Val Phe Thr Ser Cys Glu Leu Tyr His Tyr  
5 10 15 20

gag gag tgt gtt aga ggt acg act gta cta cta aaa gaa cct tgc cca 392  
 Gln Glu Cys Val Arg Gly Thr Thr Val Leu Leu Lys Glu Pro Cys Pro  
 25 30 35

tca gga aca tac gag ggc aat tca cca ttt cac cct ctt gct gac aat 440  
Ser Gly Thr Tyr Glu Gly Asn Ser Pro Phe His Pro Leu Ala Asp Asn  
40 45 50

aaa ttt gca cta act tgc act agc aca cac ttt gct ttt gct tgt gct 488  
Lys Phe Ala Leu Thr Cys Thr Ser Thr His Phe Ala Phe Ala Cys Ala  
55 60 65

gac ggt act cga cat acc tat cag ctg cgt gca aga tca gtt tca cca 536  
Asp Gly Thr Arg His Thr Tyr Gln Leu Arg Ala Arg Ser Val Ser Pro  
70 75 80

aaa ctt ttc atc aga caa gag gag gtt caa caa gag ctc tac tcg cca 584  
Lys Leu Phe Ile Arg Gln Glu Glu Val Gln Gln Glu Leu Tyr Ser Pro  
85 90 95 100

ctt ttt ctc att gtt gct gct cta gta ttt tta ata ctt tgc ttc acc 632  
 Leu Phe Leu Ile Val Ala Ala Leu Val Phe Leu Ile Leu Cys Phe Thr  
 105 110 115

att aag aga aag aca gaa tgaatgagct cactttaatt gacttctatt 680  
Ile Lys Arg Lys Thr Glu  
120

tgtgcttttt agcctttctg ctattccttg ttttaataat gcttattata ttttggtttt 740

cactcgaat ccaggatcta gaagaacctt gtaccaaagt ctaaacgaac atgaaacttc 800

tcattgtttt gacttgtatt tctctatgca gttgcatatg cactgtagta cagcgctgtg 860

S226CAS111.ST25

```

catctaataa acctcatgtg cttgaagatc cttgtaaggt acaacactag gggtaatact    920
tatagcactg cttggccttg tgctctagga aagggttttac cttttcatag atggcacact    980
atgggttcaaa catgcacacc taatgttact atcaactgtc aagatccagc tggtggtgcg   1040
cttatagcta ggtgttggtta ctttcatgaa ggtcaccaaa ctgctgcatt tagagacgta   1100
cttggtgttt taaataaacg aacaaattaa aatgtctgat aatggacccc aatcaaacca   1160
acgtagtgcc ccccgcata catttggtgg acccacagat tcaactgaca ataaccagaa   1220
tggaggacgc a                                     1231

```

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 24

```

Met Lys Ile Ile Leu Phe Leu Thr Leu Ile Val Phe Thr Ser Cys Glu
 1           5           10          15

Leu Tyr His Tyr Gln Glu Cys Val Arg Gly Thr Thr Val Leu Leu Lys
          20          25          30

Glu Pro Cys Pro Ser Gly Thr Tyr Glu Gly Asn Ser Pro Phe His Pro
      35          40          45

Leu Ala Asp Asn Lys Phe Ala Leu Thr Cys Thr Ser Thr His Phe Ala
 10          55          60

Phe Ala Cys Ala Asp Gly Thr Arg His Thr Tyr Gln Leu Arg Ala Arg
 65          70          75          80

Ser Val Ser Pro Lys Leu Phe Ile Arg Gln Glu Glu Val Gln Gln Glu
          85          90          95

Leu Tyr Ser Pro Leu Phe Leu Ile Val Ala Ala Leu Val Phe Leu Ile
      100          105          110

Leu Cys Phe Thr Ile Lys Arg Lys Thr Glu
      115          120

```

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 1231

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS



**. <220>**

<222> (650)..(781)

**<223>**

<210> 26

<211> 44

S226CAS111.ST25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 26

Met Asn Glu Leu Thr Leu Ile Asp Phe Tyr Leu Cys Phe Leu Ala Phe  
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Val Leu Ile Met Leu Ile Ile Phe Trp Phe Ser Leu  
 20 25 30

Glu Ile Gln Asp Leu Glu Glu Pro Cys Thr Lys Val  
 35 40

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 1231

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (791)..(907)

&lt;223&gt;

<400> 27  
 taccgtattg gaaactataa attaaataca gaccacgccg gtagcaacga caatattgct 60  
 ttgctagtac agtaagtgc aacagatggt tcatcttggt gacttccagg ttacaatagc 120  
 agagatattg attatcatta tgaggacttt caggattgct atttggaatc ttgacgttat 180  
 aataagttca atagtgcagac aattatttta gcctctaact aagaagaatt attcggagtt 240  
 agatgatgaa gaacctatgg agttagatta tccataaaac gaacatgaaa attattctct 300  
 tcctgacatt gattgtattt acatcttgcg agctatatca ctatcaggag tgtgttagag 360  
 gtacgactgt actactaaaa gaaccttgcc catcaggaac atacgagggc aattcaccat 420  
 ttcaccctct tgctgacaat aaatttgcac taacttgcac tagcacacac tttgcttttg 480  
 cttgtgctga cggtactcga catacctatc agctgcgtgc aagatcagtt tcaccaaacc 540  
 ttttcatcag acaagaggag gttcaacaag agctctactc gccacttttt ctcatgtgtg 600  
 ctgctctagt atttttaata ctttgcttca ccattaagag aaagacagaa tgaatgagct 660  
 cactttaatt gacttctatt tgtgcttttt agcctttctg ctattccttg ttttaataat 720  
 gcttattata ttttggtttt cactcgaaat ccaggatcta gaagaacctt gtaccaaagt 780

S226CAS111.ST25

ctaaacgaac	atg	aaa	ctt	ctc	att	gtt	ttg	act	tgt	att	tct	cta	tgc	829
	Met	Lys	Leu	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Ile	Ser	Leu	Cys	
	1				5					10				
agt	tgc	ata	tgc	act	gta	gta	cag	cgc	tgt	gca	tct	aat	aaa	877
Ser	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Val	Gln	Arg	Cys	Ala	Ser	Asn	Lys	
	15					20					25			
gtg	ctt	gaa	gat	cct	tgt	aag	gta	caa	cac	taggggtaat	acttatagca			927
Val	Leu	Glu	Asp	Pro	Cys	Lys	Val	Gln	His					
	30				35									
ctgcttggct	ttgtgctcta	ggaaagggtt	taccttttca	tagatggcac	actatgggtc									987
aaacatgcac	acctaattgtt	actatcaact	gtcaagatcc	agctgggtgg	gcgcttatag									1047
ctagggtgttg	gtaccttcat	gaaggtcacc	aaactgctgc	atttagagac	gtacttgttg									1107
ttttaataaa	acgaacaaat	taaaatgtct	gataatggac	cccaatcaaa	ccaacgtagt									1167
gccccccgca	ttacatttgg	tggaccaca	gattcaactg	acaataacca	gaatggagga									1227
cgca														1231

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 28

Met	Lys	Leu	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Cys	Ile	Ser	Leu	Cys	Ser	Cys	Ile
1				5					10					15	

Cys	Thr	Val	Val	Gln	Arg	Cys	Ala	Ser	Asn	Lys	Pro	His	Val	Leu	Glu
			20					25					30		

Asp	Pro	Cys	Lys	Val	Gln	His
		35				

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 1231

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (876)..(1127)

&lt;223&gt;

## S226CAS111.ST25

<400> 29  
taccgtattg gaaactataa attaaataca gaccacgccg gtagcaacga caatattgct 60  
ttgctagtac agtaagtac aacagatggt tcatcttggt gacttccagg ttacaatagc 120  
agagatattg attatcatta tgaggacttt caggattgct atttggaatc ttgacgttat 180  
aataagttca atagtggagac aattatttaa gcctctaact aagaagaatt attcggagtt 240  
agatgatgaa gaacctatgg agttagatta tccataaaac gaacatgaaa attattctct 300  
tcctgacatt gattgtattt acatcttgcg agctatatca ctatcaggag tgtgttagag 360  
gtacgactgt actactaaaa gaaccttgcc catcaggaaac atacgagggc aattcaccat 420  
ttcacccctct tgctgacaat aaatttgcac taacttgcac tagcacacac tttgcttttg 480  
cttggtgctga cgggtactcga catacctatc agctgcgtgc aagatcagtt tcaccaaacc 540  
ttttcatcag acaagaggag gttcaacaag agctctactc gccacttttt ctcatgtgtg 600  
ctgctctagt atttttaata ctttgcttca ccattaagag aaagacagaa tgaatgagct 660  
cactttaatt gacttctatt tgtgcttttt agcctttctg ctattccttg ttttaataat 720  
gcttattata ttttggtttt cactcgaaat ccaggatcta gaagaacctt gtaccaaagt 780  
ctaaacgaac atgaaacttc tcattgtttt gacttgtatt tctctatgca gttgcatatg 840  
cactgtagta cagcgctgtg catctaataa acctc atg tgc ttg aag atc ctt 893  
Met Cys Leu Lys Ile Leu  
1 5  
gta agg tac aac act agg ggt aat act tat agc act gct tgg ctt tgt 941  
Val Arg Tyr Asn Thr Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Thr Ala Trp Leu Cys  
10 15 20  
gct cta gga aag gtt tta cct ttt cat aga tgg cac act atg gtt caa 989  
Ala Leu Gly Lys Val Leu Pro Phe His Arg Trp His Thr Met Val Gln  
25 30 35  
aca tgc aca cct aat gtt act atc aac tgt caa gat cca gct ggt ggt 1037  
Thr Cys Thr Pro Asn Val Thr Ile Asn Cys Gln Asp Pro Ala Gly Gly  
40 45 50  
gcg ctt ata gct agg tgt tgg tac ctt cat gaa ggt cac caa act gct 1085  
Ala Leu Ile Ala Arg Cys Trp Tyr Leu His Glu Gly His Gln Thr Ala  
55 60 65 70  
gca ttt aga gac gta ctt gtt gtt tta aat aaa cga aca aat 1127  
Ala Phe Arg Asp Val Leu Val Val Leu Asn Lys Arg Thr Asn  
75 80  
taaaatgtct gataatggac cccaatcaaa ccaacgtagt gcccccgca ttacatttgg 1187  
tggaaccaca gattcaactg acaataacca gaatggagga cgca 1231

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

S226CAS111.ST25

&lt;400&gt; 30

Met Cys Leu Lys Ile Leu Val Arg Tyr Asn Thr Arg Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10 15

Ser Thr Ala Trp Leu Cys Ala Leu Gly Lys Val Leu Pro Phe His Arg  
 20 25 30

Trp His Thr Met Val Gln Thr Cys Thr Pro Asn Val Thr Ile Asn Cys  
 35 40 45

Gln Asp Pro Ala Gly Gly Ala Leu Ile Ala Arg Cys Trp Tyr Leu His  
 50 55 60

Glu Gly His Gln Thr Ala Ala Phe Arg Asp Val Leu Val Val Leu Asn  
 65 70 75 80

Lys Arg Thr Asn

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 21221

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 31  
 atggagagcc ttgttcttgg tgtcaacgag aaaacacacg tccaactcag tttgcctgtc 60  
 cttcagggtta gagacgtgct agtgcgtggc ttcggggact ctgtggaaga ggccctatcg 120  
 gaggcacgtg aacacctcaa aaatggcact tgtggtctag tagagctgga aaaaggcgta 180  
 ctgccccagc ttgaacagcc ctatgtgttc attaaacgtt ctgatgcctt aagcaccaat 240  
 cacggccaca aggtcgttga gctgggttga gaaatggacg gcattcagta cggtcgtagc 300  
 ggtataacac tgggagtact cgtgccacat gtggggcgaac cccaattgc ataccgcaat 360  
 gttcttcttc gtaagaacgg taataagggg gccggtggc atagctatgg catcgatcta 420  
 aagtcttatg acttaggtga cgagcttggc actgatccca ttgaagatta tgaacaaaac 480  
 tggaacacta agcatggcag tgggtgcactc cgtgaactca ctcgtgagct caatggaggt 540  
 gcagtcactc gctatgtcga caacaatttc tgtggcccag atgggtaccc tcttgattgc 600  
 atcaaagatt ttctcgcacg cgcgggcaag tcaatgtgca ctctttccga acaacttgat 660  
 tacatcgagt cgaagagagg tgtctactgc tgccgtgacc atgagcatga aattgcctgg 720  
 ttcactgagc gctctgataa gagctacgag caccagacac ctttcgaaat taagagtgcc 780  
 aagaaatttg acactttcaa aggggaatgc ccaaagtgtg tgtttcctct taactcaaaa 840  
 gtcaaagtca ttcaaccacg tgttgaaaag aaaaagactg aggggtttcat ggggcgtata 900

S226CAS111.ST25

cgctctgtgt accctgttgc atctccacag gagtgtaaca atatgcactt gtctaccttg	960
atgaaatgta atcattgcga tgaagtttca tggcagacgt gcgactttct gaaagccact	1020
tgtgaacatt gtggcactga aaatttagtt attgaaggac ctactacatg tgggtaccta	1080
cctactaatg ctgtagtgaa aatgccatgt cctgcctgtc aagaccaga gattggacct	1140
gagcatagtg ttgcagatta tcacaaccac tcaaacattg aaactcgact ccgcaaggga	1200
ggtaggacta gatgttttgg aggctgtgtg tttgcctatg ttggctgcta taataagcgt	1260
gcctactggg ttcctcgtgc tagtgctgat attggctcag gccatactgg cattactggt	1320
gacaatgttg agaccttgaa tgaggatctc cttgagatac tgagtcgtga acgtgttaac	1380
attaacattg ttggcgattt tcatttgaat gaagaggttg ccatcatttt ggcattctttc	1440
tctgcttcta caagtgcctt tattgacact ataaagagtc ttgattacaa gtctttcaaa	1500
accattgttg agtcctgcgg taactataaa gttaccaagg gaaagccgt aaaagggtgct	1560
tggaaacattg gacaacagag atcagtttta acaccactgt gtggttttcc ctcacaggct	1620
gctgggtgta tcagatcaat ttttgcgcgc aacttgatg cagcaaacca ctcaattcct	1680
gatttgcaaa gagcagctgt caccatactt gatggatttt ctgaacagtc attacgtctt	1740
gtcgacgcca tggtttatac ttcagacctg ctcaccaaca gtgtcattat tatggcatat	1800
gtaactgggtg gtcttgtaca acagacttct cagtgggtgt ctaatctttt gggcactact	1860
gttgaaaaac tcaggcctat ctttgaatgg attgaggcga aacttagtgc aggagttgaa	1920
tttctcaagg atgcttggga gattctcaaa tttctcatta cagggtgtttt tgacatcgtc	1980
aagggtcaaa tacaggttgc ttcagataac atcaaggatt gtgtaaaatg cttcattgat	2040
gttgtaaca aggcaactga aatgtgcatt gatcaagtca ctatcgctgg cgaaagttg	2100
cgatcactca acttaggtga agtcttcatc gctcaaagca agggacttta ccgtcagtgt	2160
atacgtggca aggagcagct gcaactactc atgcctctta aggcaccaa agaagtaacc	2220
tttcttgaag gtgattcaca tgacacagta cttacctctg aggaggttgt tctcaagaac	2280
ggatgaactcg aagcactcga gacgcccgtt gatagcttca caaatggagc tatcgttggc	2340
acaccagtct gtgtaaatgg cctcatgctc ttagagatta aggacaaaga acaatactgc	2400
gcattgtctc ctggtttact ggctacaaac aatgtctttc gcttaaaagg ggggtgcacca	2460
attaaggtg taacctttgg agaagatact gtttgggaag ttcaagggtta caagaatgtg	2520
agaatcacat ttgagcttga tgaacgtgtt gacaaagtgc ttaatgaaaa gtgctctgtc	2580
tacactgttg aatccggtac cgaagtact gagtttgcag gtgtttagc agaggctgtt	2640
gtgaagactt tacaaccagt ttctgatctc cttaccaaca tgggtattga tcttgatgag	2700
tggagtgtag ctacattcta cttatttgat gatgctgggtg aagaaaactt ttcacacgt	2760
atgtattgtt ctttttacc tccagatgag gaagaagg agcatgcaga gtgtgaggaa	2820
gaagaaattg atgaaacctg tgaacatgag tacggtacag aggatgatta tcaaggctc	2880
cctctggaat ttgggtgcctc agctgaaaca gttcgagttg aggaagaaga agaggaagac	2940

S226CAS111.ST25

tggctggatg atactactga gcaatcagag attgagccag aaccagaacc tacacctgaa	3000
gaaccagtta atcagtttac tggttattta aaacttactg acaatgttgc cattaaatgt	3060
gttgacatcg ttaaggaggc acaaagtgct aatcctatgg tgattgtaaa tgctgctaac	3120
atacacctga aacatggtgg tgggtgtagca ggtgcactca acaaggcaac caatggtgcc	3180
atgcaaaagg agagtgatga ttacattaag ctaaatggcc ctcttacagt aggagggctct	3240
tgtttgcttt ctggacataa tcttgctaag aagtgtctgc atgttggttg acctaaccta	3300
aatgcagggtg aggacatcca gcttcttaag gcagcatatg aaaatttcaa ttcacaggac	3360
atcttacttg caccattggt gtcagcaggc atatttggtg ctaaaccact tcagtcttta	3420
caagtgtgcg tgcagacggt tcgtacacag gtttatattg cagtcaatga caaagctctt	3480
tatgagcagg ttgtcatgga ttatcttgat aacctgaagc ctagagtgga agcacctaaa	3540
caagaggagc caccaaacac agaagattcc aaaactgagg agaaatctgt cgtacagaag	3600
cctgtcgaatg tgaagccaaa aattaaggcc tgcattgatg aggttaccac aacactggaa	3660
gaaactaagt ttcttaccaa taagttactc ttgtttgctg atatcaatgg taagctttac	3720
catgattctc agaacatgct tagagggtgaa gatatgtctt tccttgagaa ggatgcacct	3780
tacatggtag gtgatgttat cactagtggg gatatcactt gtgttgtaat accctccaaa	3840
aaggctggtg gcactactga gatgctctca agagctttga agaaagtgcc agttgatgag	3900
tatataacca cgtaccctgg acaaggatgt gctgggtata cacttgagga agctaagact	3960
gctcttaaga aatgcaaadc tgcattttat gtactacctt cagaagcacc taatgctaag	4020
gaagagattc taggaactgt atcctggaat ttgagagaaa tgcttgctca tgctgaagag	4080
acaagaaaat taatgcctat atgcatggat gttagagcca taatggcaac catccaacgt	4140
aagtataaag gaattaaaat tcaagagggc atcgttgact atgggtgtccg attcttcttt	4200
tatactagta aagagcctgt agcttctatt attacgaagc tgaactctct aaatgagccg	4260
cttgtcacaa tgccaattgg ttatgtgaca catggtttta atcttgagga ggctgcgcgc	4320
tgtatgcgtt ctcttaaagc tcctgccgta gtgtcagtat catcaccaga tgctgttact	4380
acataaatg gatacctcac ttcgtcatca aagacatctg aggagcactt tgtagaaaca	4440
gtttcttttg ctggctctta cagagattgg tcctattcag gacagcgtac agagttaggt	4500
gttgaatttc ttaagcgtgg tgacaaaatt gtgtaccaca ctctggagag ccccgtcgag	4560
tttcatcttg acggtgaggt tctttcactt gacaaactaa agagtctctt atccctgcgg	4620
gagggttaaga ctataaaagt gttcacaaact gtggacaaca ctaatctcca cacacagctt	4680
gtggatatgt ctatgacata tggacagcag tttgggtccaa catacttgga tgggtgctgat	4740
gttacaaaaa ttaaacctca tgtaaatcat gagggtaaga ctttctttgt actacctagt	4800
gatgacacac tacgtagtga agctttcgag tactaccata ctcttgatga gagttttctt	4860
ggtaggtaca tgtctgcttt aaaccacaca aagaaatgga aatttcctca agttgggtgg	4920
ttaaactcaa ttaaatgggc tgataacaat tgttatttgt ctagtgtttt attagcactt	4980

S226CAS111.ST25

caacagcttg aagtcaaatt caatgcacca gcacttcaag aggcttatta tagagcccgt	5040
gctgggtgatg ctgctaactt ttgtgcactc atactcgctt acagtaataa aactgttggc	5100
gagcttggtg atgtcagaga aactatgacc catcttctac agcatgctaa tttggaatct	5160
gcaaagcgag ttcttaatgt ggtgtgtaaa cattgtggtc agaaaactac taccttaacg	5220
ggtgtagaag ctgtgatgta tatgggtact ctatcttatg ataatcttaa gacagggtgtt	5280
tccattccat gtgtgtgtgg tcgtgatgct acacaatatc tagtacaaca agagtcttct	5340
tttgttatga tgtctgcacc acctgctgag tataaattac agcaaggtag attcttatgt	5400
gcgaatgagt acactggtaa ctatcagtggt ggtcattaca ctcatataac tgctaaggag	5460
accctctatc gtattgacgg agctcacctt acaaagatgt cagagtacaa aggaccagtg	5520
actgatgttt tctacaagga aacatcttac actacaacca tcaagcctgt gtcgtataaa	5580
ctcgatggag ttacttacac agagattgaa ccaaaattgg atgggtatta taaaaaggat	5640
aatgcttact atacagagca gcctatagac cttgtaccaa ctcaaccatt accaaatgcg	5700
agttttgata atttcaaact cacatgttct aacacaaaat ttgctgatga tttaaatcaa	5760
atgacaggct tcacaaagcc agcttcacga gagctatctg tcacattctt cccagacttg	5820
aatggcgatg tagtggctat tgactataga cactattcag cgagtttcaa gaaagggtgct	5880
aaattactgc ataagccaat tgtttggcac attaaccagg ctacaaccaa gacaacgttc	5940
aaaccaaaca cttgggtgttt acgttgtctt tggagtacaa agccagtaga tacttcaa	6000
tcatttgaag ttctggcagt agaagacaca caaggaatgg acaatcttgc ttgtgaaagt	6060
caacaacca cctctgaaga agtagtgga aatcctacca tacagaagga agtcatagag	6120
tgtgacgtga aaactaccga agttgtaggc aatgtcatac ttaaaccatc agatgaagg	6180
gttaaagtaa cacaagagtt aggtcatgag gatcttatgg ctgcttatgt ggaaaacaca	6240
agcattacca ttaagaaacc taatgagctt tcactagcct taggttttaa aacaattgcc	6300
actcatggta ttgctgcaat taatagtgtt ccttggagta aaattttggc ttatgtcaaa	6360
ccattcttag gacaagcagc aattacaaca tcaaattgag ctaagagatt agcacaacgt	6420
gtgtttaaca attatatgcc ttatgtgttt acattattgt tccaattgtg tacttttact	6480
aaaagtacca attctagaat tagagcttca ctacctaca ctattgctaa aaatagtgtt	6540
aagagtgttg ctaaattatg tttggatgcc ggcattaatt atgtgaagtc acccaaattt	6600
tctaaattgt tcacaatcgc tatgtggcta ttgttgtaaa gtatttgctt aggttctcta	6660
atctgtgtaa ctgctgcttt tgggtgactc ttatctaatt ttggtgctcc ttcttattgt	6720
aatggcggtta gagaattgta tcttaattcg tctaacgtta ctactatgga tttctgtgaa	6780
ggttcttttc cttgcagcat ttgtttaagt ggattagact cccttgattc ttatccagct	6840
cttgaaacca ttcagggtgac gatttcacg tacaagctag acttgacaat tttagggtctg	6900
gccgctgagt gggttttggc atatatgttg ttcacaaaat tcttttattt attagggtctt	6960
tcagctataa tgcagggtgtt ctttggctat ttgtgtagtc atttcatcag caattcttgg	7020



S226CAS111.ST25

```

ctcatgtggt ttatcattag tattgtacaa atggcaccg tttctgcaat ggtaggatg 7080
tacatcttct ttgcttcttt ctactacata tggaagagct atgttcatat catggatggt 7140
tgcacctctt cgacttgcat gatgtgctat aagcgcaatc gtgccacacg cgttgagtgt 7200
acaactattg ttaatggcat gaagagatct ttctatgtct atgcaaattg aggccgtggc 7260
ttctgcaaga ctcaaatgga gaattgtctc aattgtgaca ctttttgac tggtagtaca 7320
ttcattagtg atgaagttgc tcgtgatttg tcaactcagt ttaaaagacc aatcaaccct 7380
actgaccagt catcgatatat tgttgatagt gttgctgtga aaaatggcgc gcttcacctc 7440
tactttgaca aggctgggtca aaagacctat gagagacatc cgctctccca ttttgtcaat 7500
ttagacaatt tgagagctaa caacactaaa gggtcactgc ctattaatgt catagttttt 7560
gatggcaagt ccaaatgcga cgagtctgct tctaagtctg cttctgtgta ctacagtcag 7620
ctgatgtgcc aacctattct gttgcttgac caagctcttg tatcagacgt tggagatagt 7680
actgaagttt ccgttaagat gtttgatgct tatgtcgaca ctttttcagc aacttttagt 7740
gttcctatgg aaaaacttaa ggcaattggt gctacagctc acagcgagtt agcaaaggg 7800
gtagcttttag atggtgtcct ttctacattc gtgtcagctg cccgacaagg tgttgttgat 7860
accgatgttg acacaaagga tgttattgaa tgtctcaaac tttcacatca ctctgactta 7920
gaagtgcagc gtgacagttg taacaatttc atgctcacct ataataaggt tgaaaacatg 7980
acgcccagag atcttggcgc atgtattgac tgtaatgcaa ggcataatca tgcccaagta 8040
gcaaaaagtc acaatgtttc actcatctgg aatgtaaaag actacatgtc tttatctgaa 8100
cagctgcgta aacaaattcg tagtgctgcc aagaagaaca acataccttt tagactaact 8160
tgtgctacaa ctagacaggt tgtcaatgtc ataactacta aaatctcact caaggggtggt 8220
aagattgtta gtacttgttt taaacttatg ctttaaggcca cattattgtg cgttcttgct 8280
gcattggttt gttatatcgt tatgccagta catacattgt caatccatga tggttacaca 8340
aatgaaatca ttgggtacaa agccattcag gatggtgtca ctcgtgacat catttctact 8400
gatgattgtt ttgcaaataa acatgctggt tttgacgcat ggtttagcca gcgtgggtggt 8460
tcatacaaaa atgacaaaag ctgccctgta gtagctgcta tcattacaag agagattggt 8520
ttcatagtgc ctggcttacc gggactgtg ctgagagcaa tcaatggtga cttcttgcat 8580
tttctacctc gtgttttttag tgctgttggc aacatttgct acacacctc caaactcatt 8640
gagtatagtg attttgctac ctctgcttgc gttcttgctg ctgagtgtac aatttttaag 8700
gatgctatgg gcaaacctgt gccatattgt tatgacacta atttgctaga gggttctatt 8760
tcttatagtg agcttcgtcc agacactcgt tatgtgctta tggatgggtc catcatacag 8820
tttcctaaca cttacctgga gggttctggt agagtagtaa caacttttga tgctgagtac 8880
tgtagacatg gtacatgcga aaggctcaga gtaggtatgt gcctatctac cagtggtaga 8940
tgggttctta ataattgagc ttacagagct ctatcaggag ttttctgtgg tgttgatgcg 9000
atgaatctca tagctaacat ctttactcct cttgtgcaac ctgtgggtgc tttagatgtg 9060

```

S226CAS111.ST25

tctgcttcag	tagtggctgg	tggtattatt	gccatattgg	tgacttgtgc	tgcctactac	9120
tttatgaaat	tcagacgtgt	ttttggtgag	tacaaccatg	ttgttgctgc	taatgcactt	9180
ttgtttttga	tgtctttcac	tatactctgt	ctggtaccag	cttacagctt	tctgccggga	9240
gtctactcag	tcttttactt	gtacttgaca	ttctatttca	ccaatgatgt	ttcattcttg	9300
gctcaccttc	aatgggtttgc	catgttttct	cctattgtgc	ctttttggat	aacagcaatc	9360
tatgtattct	gtatttctct	gaagcactgc	cattggttct	ttaacaacta	tcttaggaaa	9420
agagtcatgt	ttaatggagt	tacatttagt	accttcgagg	aggctgcttt	gtgtaccttt	9480
ttgctcaaca	aggaaatgta	cctaaaattg	cgtagcgaga	cactgttgcc	acttacacag	9540
tataacaggt	atcttgctct	atataacaag	tacaagtatt	tcagtggagc	cttagatact	9600
accagctatc	gtgaagcagc	ttgctgccac	ttagcaaagg	ctctaaatga	ctttagcaac	9660
tcaggtgctg	atgttctcta	ccaaccacca	cagacatcaa	tcacttctgc	tgttctgcag	9720
agtggtttta	ggaaaatggc	attcccgtca	ggcaaagttg	aaggggtgcat	ggtacaagta	9780
acctgtggaa	ctacaactct	taatggattg	tggttggatg	acacagtata	ctgtccaaga	9840
catgtcattt	gcacagcaga	agacatgctt	aatcctaact	atgaagatct	gctcattcgc	9900
aaatccaacc	atagctttct	tgttcaggct	ggcaatgttc	aacttcgtgt	tattggccat	9960
tctatgcaaa	attgtctgct	taggcttaaa	gttgatactt	ctaaccctaa	gacaccaag	10020
tataaatttg	tccgtatcca	acctggtcaa	acattttcag	ttctagcatg	ctacaatggt	10080
tcaccatctg	gtgtttatca	gtgtgccatg	agacctaata	ataccattaa	aggttctttc	10140
cttaatggat	catgtggtag	tgttggtttt	aacattgatt	atgattgcgt	gtctttctgc	10200
tatatgcatc	atatggagct	tccaacagga	gtacacgctg	gtactgactt	agaaggtaaa	10260
ttctatggtc	catttggtga	cagacaaact	gcacaggctg	caggtacaga	cacaaccata	10320
acattaaatg	ttttggcatg	gctgtatgct	gctgttatca	atggtgatag	gtggtttctt	10380
aatagattca	ccactacttt	gaatgacttt	aaccttggtg	caatgaagta	caactatgaa	10440
cctttgacac	aagatcatgt	tgacatattg	ggacctcttt	ctgctcaaac	aggaattgcc	10500
gtcttagata	tgtgtgctgc	tttgaaagag	ctgctgcaga	atgggatgaa	tggtcgtact	10560
atccttggtg	gcactatttt	agaagatgag	tttacaccat	ttgatgttgt	tagacaatgc	10620
tctggtgtta	ccttccaagg	taagttcaag	aaaattgtta	agggcactca	tcattggatg	10680
cttttaactt	tcttgacatc	actattgatt	cttgttcaaa	gtacacagtg	gtcactgttt	10740
ttctttgttt	acgagaatgc	tttcttgcca	tttactcttg	gtattatggc	aattgctgca	10800
tgtgctatgc	tgcttggtta	gcataagcac	gcattcttgt	gcttgtttct	gttaccttct	10860
cttgcaacag	ttgcttactt	taatatgggtc	tacatgcctg	ctagctgggt	gatgcgtatc	10920
atgacatggc	ttgaattggc	tgacactagc	ttgtctgggt	ataggcttaa	ggattgtgtt	10980
atgtatgctt	cagctttagt	tttgcttatt	ctcatgacag	ctcgactgt	ttatgatgat	11040
gctgctagac	gtgtttggac	actgatgaat	gtcattacac	ttgtttacaa	agtctactat	11100

S226CAS111.ST25

ggtaatgctt	tagatcaagc	tatttccatg	tgggccttag	ttatttctgt	aacctctaac	11160
tattctggtg	tcgttacgac	tatcatgttt	ttagctagag	ctatagtgtt	tgtgtgtgtt	11220
gagtattacc	cattgttatt	tattactggc	aacaccttac	agtgtatcat	gcttgtttat	11280
tgtttcttag	gctattgttg	ctgctgctac	tttggccttt	tctgtttact	caaccgttac	11340
ttcaggctta	ctcttggtgt	ttatgactac	ttggtctcta	cacaagaatt	taggtatatg	11400
aactcccagg	ggcttttgcc	tcctaagagt	agtattgatg	ctttcaagct	taacattaag	11460
ttgttgggta	ttggaggtaa	accatgtatc	aagggttgcta	ctgtacagtc	taaaatgtct	11520
gacgtaaagt	gcacatctgt	ggtactgctc	tcggttcttc	aacaacttag	agtagagtca	11580
tcttctaaat	tgtgggcaca	atgtgtacaa	ctccacaatg	atattcttct	tgcaaaagac	11640
acaactgaag	ctttcgagaa	gatggtttct	cttttgtctg	ttttgctatc	catgcagggt	11700
gctgtagaca	ttaatagggt	gtgcgaggaa	atgctcgata	accgtgctac	tcttcagggt	11760
attgcttcag	aatttagttc	tttaccatca	tatgccgctt	atgccactgc	ccaggaggcc	11820
tatgagcagg	ctgtagctaa	tggtgattct	gaagtcgttc	tcaaaaagtt	aaagaaatct	11880
ttgaatgtgg	ctaaatctga	gtttgaccgt	gatgctgcca	tgcaacgcaa	gttggaaaag	11940
atggcagatc	aggctatgac	ccaaatgtac	aaacaggcaa	gatctgagga	caagagggca	12000
aaagtaacta	gtgctatgca	aacaatgctc	ttcactatgc	ttaggaagct	tgataatgat	12060
gcacttaaca	acattatcaa	caatgcgcgt	gatggttgtg	ttccactcaa	catcatacca	12120
ttgactacag	cagccaaact	catgggtgtt	gtccctgatt	atggtaccta	caagaacact	12180
tgtgatggta	acacctttac	atatgcatct	gcactctggg	aaatccagca	agttgttgat	12240
gcggatagca	agattgttca	acttagtgaa	attaacatgg	acaattcacc	aaatttggtc	12300
tggcctctta	ttgttacagc	tctaagagcc	aactcagctg	ttaaactaca	gaataatgaa	12360
ctgagtcag	tagcactacg	acagatgtcc	tgtgcggctg	gtaccacaca	aacagcttgt	12420
actgatgaca	atgcacttgc	ctactataac	aattcgaagg	gaggtagggt	tgtgctggca	12480
ttactatcag	accaccaaga	tctcaaattg	gctagattcc	ctaagagtga	tggtacaggt	12540
acaatttaca	cagaactgga	accaccttgt	aggtttgtta	cagacacacc	aaaagggcct	12600
aaagtgaat	acttgactt	catcaaaggc	ttaaacaacc	taaatagagg	tatggtgctg	12660
ggcagtttag	ctgctacagt	acgtcttcag	gctggaaatg	ctacagaagt	acctgccaat	12720
tcaactgtgc	tttccttctg	tgcttttgca	gtagaccctg	ctaaagcata	taaggattac	12780
ctagcaagtg	gaggacaacc	aatcaccaac	tgtgtgaaga	tggtgtgtac	acacactggt	12840
acaggacagg	caattactgt	aacaccagaa	gctaacatgg	accaagagtc	ctttggtggt	12900
gcttcatgtt	gtctgtattg	tagatgccac	attgaccatc	caaatcctaa	aggattctgt	12960
gacttgaaag	gtaagtacgt	caaataacct	accacttggtg	ctaatagacc	agtgggtttt	13020
acacttagaa	acacagtctg	taccgtctgc	ggaatgtgga	aaggttatgg	ctgtagttgt	13080
gaccaactcc	gcgaaccctt	gatgcagtct	gcggatgcat	caacgttttt	aaacgggttt	13140

S226CAS111.ST25

gcggtgtaag	tgcagcccg	cttacaccgt	gcggcacagg	cactagtact	gatgtcgtct	13200
acagggcttt	tgatatttac	aacgaaaaag	ttgctgggtt	tgcaaagttc	ctaaaaacta	13260
attgctgtcg	cttccaggag	aaggatgagg	aaggcaattt	attagactct	tactttgtag	13320
ttaagaggca	tactatgtct	aactaccaac	atgaagagac	tatttataac	ttgggttaaag	13380
attgtccagc	ggttgctgtc	catgactttt	tcaagtttag	agtagatggt	gacatggtac	13440
cacatatatc	acgtcagcgt	ctaactaaat	acacaatggc	tgatttagtc	tatgctctac	13500
gtcattttga	tgagggtaat	tgtgatacat	taaaagaaat	actcgtcaca	tacaattgct	13560
gtgatgatga	ttatttcaat	aagaaggatt	ggtatgactt	cgtagagaat	cctgacatct	13620
tacgcgtata	tgctaactta	ggtgagcgtg	tacgccaatc	attattaaag	actgtacaat	13680
tctgcgatgc	tatgcgtgat	gcaggcattg	taggcgtact	gacattagat	aatcaggatc	13740
ttaatgggaa	ctgggtacgat	ttcgggtgatt	tcgtacaagt	agcaccaggc	tgcggaagttc	13800
ctattgtgga	ttcatattac	tcattgctga	tgcccatcct	cactttgact	agggcattgg	13860
ctgctgagtc	ccatatggat	gctgatctcg	caaaaccact	tattaagtgg	gatttgctga	13920
aatatgattt	tacggaagag	agactttgtc	tcttcgaccg	ttattttaaa	tattgggacc	13980
agacatacca	tccaattgt	attaactggt	tggatgatag	gtgtatcctt	cattgtgcaa	14040
actttaatgt	gttattttct	actgtgtttc	cacctacaag	ttttggacca	ctagtaagaa	14100
aaatatttgt	agatgggtgt	ccttttggtg	tttcaactgg	ataccatttt	cgtgagttag	14160
gagtcgtaca	taatcaggat	gtaaacttac	atagctcgcg	tctcagtttc	aaggaaacttt	14220
tagtgatgc	tgctgatcca	gctatgcgat	cagcttctgg	caattttattg	ctagataaac	14280
gcactacatg	cttttcagta	gctgcactaa	caaacaatgt	tgcttttcaa	actgtcaaac	14340
ccggtaat	taataaagac	ttttatgact	ttgctgtgtc	taaagggttc	tttaaggaag	14400
gaagtctgt	tgaactaaaa	cacttcttct	ttgctcagga	tggcaacgct	gctatcagtg	14460
attatgacta	ttatcgttat	aatctgccaa	caatgtgtga	tatcagacaa	ctcctattcg	14520
tagttgaagt	tgttgataaa	tactttgatt	gttacgatgg	tggctgtatt	aatgccaacc	14580
aagtaatcgt	taacaatctg	gataaatcag	ctgggtttccc	atttaataaa	tggggtaagg	14640
ctagacttta	ttatgactca	atgagttatg	aggatcaaga	tgactttttc	gcgtatacta	14700
agcgtaatgt	catccctact	ataactcaaa	tgaatcttaa	gtatgccatt	agtgcaaaga	14760
atagagctcg	caccgtagct	ggtgtctcta	tctgtagtac	tatgacaaat	agacagtttc	14820
atcagaaatt	attgaagtca	atagccgccca	ctagaggagc	tactgtggta	attggaacaa	14880
gcaagtttta	cggtggctgg	cataatatgt	taaaaactgt	ttacagtgat	gtagaaactc	14940
cacaccttat	gggttgggat	tatccaaaat	gtgacagagc	catgcctaac	atgcttagga	15000
taatggcctc	tcttggttct	gctcgcaaac	ataacacttg	ctgtaactta	tcacaccggt	15060
tctacagggt	agctaacgag	tgtgcgcaag	tattaagtga	gatgggtcatg	tgtggcggt	15120
cactatatgt	taaaccagggt	ggaacatcat	ccggtgatgc	tacaactgct	tatgctaata	15180

## S226CAS111.ST25

gtgtctttaa catttgtcaa gctgttacag ccaatgtaaa tgcacttctt tcaactgatg 15240  
 gtaataagat agctgacaag tatgtccgca atctacaaca caggctctat gagtgtctct 15300  
 atagaaatag ggatgttgat catgaattcg tggatgagtt ttacgcttac ctgcgtaaac 15360  
 atttctccat gatgattctt tctgatgatg ccgttgtgtg ctataacagt aactatgcgg 15420  
 ctcaaggttt agtagctagc attaagaact ttaaggcagt tctttattat caaaataatg 15480  
 tgttcatgtc tgaggcaaaa tgttggactg agactgacct tactaaagga cctcacgaat 15540  
 tttgtcaca gcatacaatg ctagttaaac aaggagatga ttacgtgtac ctgccttacc 15600  
 cagatccatc aagaatatta ggcgcaggct gttttgtcga tgatattgtc aaaacagatg 15660  
 gtacacttat gattgaaagg ttcgtgtcac tggctattga tgcttaccca cttacaaaac 15720  
 atcctaataca ggagtatgct gatgtctttc acttgtattt acaatacatt agaaagttac 15780  
 atgatgagct tactggccac atgttggaca tgtattccgt aatgctaact aatgataaca 15840  
 cctcacggta ctgggaacct gagttttatg aggctatgta cacaccacat acagtcttgc 15900  
 aggctgtagg tgcttgtgta ttgtgcaatt cacagacttc acttcgttgc ggtgcctgta 15960  
 ttaggagacc attcctatgt tgcaagtgct gctatgacca tgtcatttca acatcacaca 16020  
 aattagtgtt gtctgttaat ccctatgttt gcaatgcccc aggttgtgat gtcactgatg 16080  
 tgacacaact gtatctagga ggtatgagct attattgcaa gtcacataag cctccatta 16140  
 gttttccatt atgtgcta at ggtcagggtt ttggtttata caaaaacaca tgtgtaggca 16200  
 gtgacaatgt cactgacttc aatgcgatag caacatgtga ttggactaat gctggcgatt 16260  
 acatacttgc caacacttgt actgagagac tcaagctttt cgcagcagaa acgctcaaag 16320  
 ccactgagga aacatttaag ctgtcatatg gtattgccac tgtacgcgaa gtactctctg 16380  
 acagagaatt gcatctttca tgggaggttg gaaaacctag accaccattg aacagaaact 16440  
 atgtctttac tgggtaccgt gtaactaaaa atagtaaagt acagattgga gagtacacct 16500  
 ttgaaaaagg tgactatggt gatgctgttg tgtacagagg tactacgaca tacaagttga 16560  
 atgttgggtga ttactttgtg ttgacatctc acactgtaat gccacttagt gcacctactc 16620  
 tagtgccaca agagcactat gtgagaatta ctggcttgta cccaacactc aacatctcag 16680  
 atgagttttc tagcaatgtt gcaaattatc aaaaggctcg catgcaaaag tactctacac 16740  
 tccaaggacc acctggtact ggtaagagtc attttgccat cggacttgct ctctattacc 16800  
 catctgctcg catagtgtat acggcatgct ctcatgcagc tgttgatgcc ctatgtgaaa 16860  
 aggcattaaa atat ttgccc atagataaat gtagtagaat catacctgcg cgtgcgcgcg 16920  
 tagagtgttt tgataaattc aaagtgaatt caacactaga acagtatgtt ttctgcaactg 16980  
 taaatgcatt gccagaaaca actgctgaca ttgtagtctt tgatgaaatc tctatggcta 17040  
 ctaattatga cttgagtgtt gtcaatgcta gacttcgtgc aaaacactac gtctatattg 17100  
 gcgatcctgc tcaattacca gcccccgca cattgctgac taaaggcaca ctagaaccag 17160  
 aatattttta ttcagtgtgc agacttatga aaacaatagg tccagacatg ttccttgga 17220

S226CAS111.ST25

cttgtcgccg	ttgtcctgct	gaaattgttg	acactgtgag	tgcttttagtt	tatgacaata	17280
agctaaaagc	acacaaggat	aagtcagctc	aatgcttcaa	aatgttctac	aaagggtgta	17340
ttacacatga	tgtttcatct	gcaatcaaca	gacctcaaat	aggcgttgta	agagaatttc	17400
ttacacgcaa	tcctgcttgg	agaaaagctg	tttttatctc	accttataat	tcacagaacg	17460
ctgtagcttc	aaaaatctta	ggattgccta	cgcagactgt	tgattcatca	caggggttctg	17520
aatatgacta	tgtcatattc	acacaaacta	ctgaaacagc	acactcttgt	aatgtcaacc	17580
gcttcaatgt	ggctatcaca	agggcaaaaa	ttggcatttt	gtgcataatg	tctgatagag	17640
atctttatga	caaactgcaa	tttacaagtc	tagaaatacc	acgtcgcaat	gtggctacat	17700
tacaagcaga	aaatgtaact	ggacttttta	aggactgtag	taagatcatt	actggctctc	17760
atcctacaca	ggcacctaca	cacctcagcg	ttgatataaa	gttcaagact	gaaggattat	17820
gtgttgacat	accaggcata	ccaaaggaca	tgacctaccg	tagactcatc	tctatgatgg	17880
gtttcaaaat	gaattaccaa	gtcaatgggt	accctaatat	gtttatcacc	cgcgaagaag	17940
ctattcgtca	cgttcgtgcg	tggattggct	ttgatgtaga	gggctgtcat	gcaactagag	18000
atgctgtggg	tactaaccta	cctctccagc	taggattttc	tacagggtgtt	aacttagtag	18060
ctgtaccgac	tggttatggt	gacactgaaa	ataacacaga	attcaccaga	gttaatgcaa	18120
aacctccacc	aggtgaccag	tttaaacatc	ttataccact	catgtataaa	ggcttgccct	18180
ggaatgtagt	gcgtattaag	atagtacaaa	tgctcagtga	tacactgaaa	ggattgtcag	18240
acagagtcgt	gttcgtcctt	tgggcgcatg	gctttgagct	tacatcaatg	aagtactttg	18300
tcaagattgg	acctgaaaga	acgtgttgtc	tgtgtgacaa	acgtgcaact	tgcttttcta	18360
cttcatcaga	tacttatgcc	tgctggaatc	attctgtggg	ttttgactat	gtctataacc	18420
catttatgat	tgatgttcag	cagtggggct	ttacgggtaa	ccttcagagt	aaccatgacc	18480
aacattgcca	ggtacatgga	aatgcacatg	tggctagttg	tgatgctatc	atgactagat	18540
gtttagcagt	ccatgagtgc	tttgtaagc	gcgttgattg	gtctgttgaa	taccctatta	18600
taggagatga	actgagggtt	aattctgctt	gcagaaaagt	acaacacatg	gttgtgaagt	18660
ctgcattgct	tgctgataag	tttccagttc	ttcatgacat	tggaaatcca	aaggctatca	18720
agtgtgtgcc	tcaggctgaa	gtagaatgga	agttctacga	tgctcagcca	tgtagtgaca	18780
aagcttacia	aatagaggaa	ctcttctatt	cttatgctac	acatcacgat	aaattcactg	18840
atgggtgtttg	tttgtttttg	aattgtaacg	ttgatcgta	cccagccaat	gcaattgtgt	18900
gtaggtttga	cacaagagtc	ttgtcaaact	tgaacttacc	aggctgtgat	ggtggtagtt	18960
tgtatgtgaa	taagcatgca	ttccacactc	cagctttcga	taaaagtgca	tttactaatt	19020
taaagcaatt	gcctttcttt	tactattctg	atagtccttg	tgagtctcat	ggcaaacaag	19080
tagtgtcgga	tattgattat	gttccactca	aatctgctac	gtgtattaca	cgatgcaatt	19140
taggtggtgc	tgtttgacga	caccatgcaa	atgagtaccg	acagtacttg	gatgcatata	19200
atatgatgat	ttctgctgga	tttagcctat	ggatttacia	acaatttgat	acttataacc	19260

S226CAS111.ST25

tgtggaatac	atttaccagg	ttacagagtt	tagaaaaatgt	ggcttataat	gttggttaata	19320
aaggacactt	tgatggacac	gccggcgaag	cacctgtttc	catcattaat	aatgctgttt	19380
acacaaaggt	agatgggtatt	gatgtggaga	tctttgaaaa	taagacaaca	cttcctgtta	19440
atgttgcatt	tgagcttttg	gctaagcgta	acattaaacc	agtgccagag	attaagatac	19500
tcaataattt	gggtgttgat	atcgctgcta	atactgtaat	ctgggactac	aaaagagaag	19560
ccccagcaca	tgtatctaca	ataggtgtct	gcacaatgac	tgacattgcc	aagaaaccta	19620
ctgagagtgc	ttgttcttca	cttactgtct	tgtttgatgg	tagagtggaa	ggacaggtag	19680
accttttttag	aaacgcccgt	aatgggtgtt	taataacaga	aggttcagtc	aaagggtctaa	19740
caccttcaaa	gggaccagca	caagctagcg	tcaatggagt	cacattaatt	ggagaatcag	19800
taaaaacaca	gtttaactac	tttaagaaaag	tagacggcat	tattcaacag	ttgcctgaaa	19860
cctacttttac	tcagagcaga	gacttagagg	attttaagcc	cagatcaca	atggaaactg	19920
actttctcga	gctcgctatg	gatgaattca	tacagcgata	taagctcgag	ggctatgcct	19980
tcgaacacat	cgtttatgga	gatttcagtc	atggacaact	tggcggctct	catttaatga	20040
taggcttagc	caagcgctca	caagattcac	cacttaaatt	agaggatttt	atccctatgg	20100
acagcacagt	gaaaaattac	ttcataacag	atgcgcaaac	aggttcatca	aaatgtgtgt	20160
gttctgtgat	tgatctttta	cttgatgact	ttgtcgagat	aataaagtca	caagatttgt	20220
cagtgatttc	aaaagtggtc	aaggttacaa	ttgactatgc	tgaaatttca	ttcatgcttt	20280
gggtgaagga	tggacatgtt	gaaaccttct	acccaaaact	acaagcaagt	caagcgtggc	20340
aaccagggtgt	tgcgatgcct	aacttgta	agatgcaaag	aatgcttctt	gaaaagtgtg	20400
accttcagaa	ttatgggtgaa	aatgctgtta	taccaaagg	aataatgatg	aatgtcgcaa	20460
agtatactca	actgtgtcaa	tacttaata	cacttacttt	agctgtaccc	tacaacatga	20520
gagttattca	ctttgggtgct	ggctctgata	aaggagttgc	accagggtaca	gctgtgtctca	20580
gacaatgggt	gccaaactggc	acactacttg	tcgattcaga	tcttaatgac	ttcgtctccg	20640
acgcagattc	tactttaatt	ggagactgtg	caacagtaca	tacggcta	aatgggacc	20700
ttattattag	cgatatgtat	gaccctagga	ccaacatgt	gacaaaagag	aatgactcta	20760
aagaaggggt	tttcacttat	ctgtgtggat	ttataaagca	aaaactagcc	ctgggtgggt	20820
ctatagctgt	aaagataaca	gagcattctt	ggaatgctga	cctttacaag	cttatgggcc	20880
atttctcatg	gtggacagct	tttggttaca	atgtaaatgc	atcatcatcg	gaagcatttt	20940
taattggggc	taactatctt	ggcaagccga	aggaacaaat	tgatggctat	accatgcatg	21000
ctaactacat	tttctggagg	aacacaaatc	ctatccagtt	gtcttcctat	tcactctttg	21060
acatgagcaa	atttcctctt	aaattaagag	gaactgctgt	aatgtctctt	aaggagaatc	21120
aatcaatga	tatgatattat	tctcttctgg	aaaaaggtag	gcttatcatt	agagaaaaca	21180
acagagttgt	ggtttcaagt	gatattcttg	ttaacaacta	a		21221

## S226CAS111.ST25

&lt;211&gt; 297

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 32  
 atggacccca atcaaacc aa cgtagtgccc cccgcattac atttggtgga cccacagatt 60  
 caactgacaa taaccagaat ggaggacgca atggggcaag gccaaaacag cgccgacccc 120  
 aagggtttacc caataatact gcgtcttggt tcacagctct cactcagcat ggcaaggagg 180  
 aacttagatt ccctcgaggc cagggcggtc caatcaacac caatagtggg ccagatgacc 240  
 aaattggcta ctaccgaaga gctacccgac gagttcgtgg tggtgacggc aaaatga 297

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 33

Met Asp Pro Asn Gln Thr Asn Val Val Pro Pro Ala Leu His Leu Val  
 1 5 10 15

Asp Pro Gln Ile Gln Leu Thr Ile Thr Arg Met Glu Asp Ala Met Gly  
 20 25 30

Gln Gly Gln Asn Ser Ala Asp Pro Lys Val Tyr Pro Ile Ile Leu Arg  
 35 40 45

Leu Gly Ser Gln Leu Ser Leu Ser Met Ala Arg Arg Asn Leu Asp Ser  
 50 55 60

Leu Glu Ala Arg Ala Phe Gln Ser Thr Pro Ile Val Val Gln Met Thr  
 65 70 75 80

Lys Leu Ala Thr Thr Glu Glu Leu Pro Asp Glu Phe Val Val Val Thr  
 85 90 95

Ala Lys

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 213

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS



S226CAS111.ST25

<400> 34  
 atgctgccac cgtgctacaa cttcctcaag gaacaacatt gccaaaaggc ttctacgcag 60  
 aggggaagcag aggcggcagt caagcctctt ctcgctcctc atcacgtagt cgcggtaatt 120  
 caagaaattc aactcctggc agcagtaggg gaaattctcc tgctcgaatg gctagcggag 180  
 gtggtgaaac tgccctcgcg ctattgctgc tag 213

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 35

Met Leu Pro Pro Cys Tyr Asn Phe Leu Lys Glu Gln His Cys Gln Lys  
 1 5 10 15

Ala Ser Thr Gln Arg Glu Ala Glu Ala Ala Val Lys Pro Leu Leu Ala  
 20 25 30

Pro His His Val Val Ala Val Ile Gln Glu Ile Gln Leu Leu Ala Ala  
 35 40 45

Val Gly Glu Ile Leu Leu Leu Glu Trp Leu Ala Glu Val Val Lys Leu  
 50 55 60

Pro Ser Arg Tyr Cys Cys  
 65 70

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 1377

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (67)..(1335)

&lt;223&gt;

<400> 36  
 atgaaggcca ccaaactgct gcatttagag acgtacttgt tgttttaaataaacgaacaa 60

S226CAS111.ST25																108
attaaa	atg	tct	gat	aat	gga	ccc	caa	tca	aac	caa	cgt	agt	gcc	ccc		
Met	Ser	Asp	Asn	Gly	Pro	Gln	Ser	Asn	Gln	Arg	Ser	Ala	Pro			
1				5					10							
cgc	att	aca	ttt	ggt	gga	ccc	aca	gat	tca	act	gac	aat	aac	cag	aat	156
Arg	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Pro	Thr	Asp	Ser	Thr	Asp	Asn	Asn	Gln	Asn	
15				20						25					30	
gga	gga	cgc	aat	ggg	gca	agg	cca	aaa	cag	cgc	cga	ccc	caa	ggt	tta	204
Gly	Gly	Arg	Asn	Gly	Ala	Arg	Pro	Lys	Gln	Arg	Arg	Pro	Gln	Gly	Leu	
				35					40					45		
ccc	aat	aat	act	gcg	tct	tgg	ttc	aca	gct	ctc	act	cag	cat	ggc	aag	252
Pro	Asn	Asn	Thr	Ala	Ser	Trp	Phe	Thr	Ala	Leu	Thr	Gln	His	Gly	Lys	
			50				55						60			
gag	gaa	ctt	aga	ttc	cct	cga	ggc	cag	ggc	gtt	cca	atc	aac	acc	aat	300
Glu	Glu	Leu	Arg	Phe	Pro	Arg	Gly	Gln	Gly	Val	Pro	Ile	Asn	Thr	Asn	
		65					70					75				
agt	ggt	cca	gat	gac	caa	att	ggc	tac	tac	cga	aga	gct	acc	cga	cga	348
Ser	Gly	Pro	Asp	Asp	Gln	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Ala	Thr	Arg	Arg	
	80					85					90					
gtt	cgt	ggt	ggt	gac	ggc	aaa	atg	aaa	gag	ctc	agc	ccc	aga	tgg	tac	396
Val	Arg	Gly	Gly	Asp	Gly	Lys	Met	Lys	Glu	Leu	Ser	Pro	Arg	Trp	Tyr	
95					100					105					110	
ttc	tat	tac	cta	gga	act	ggc	cca	gaa	gct	tca	ctt	ccc	tac	ggc	gct	444
Phe	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Thr	Gly	Pro	Glu	Ala	Ser	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ala	
				115					120					125		
aac	aaa	gaa	ggc	atc	gta	tgg	gtt	gca	act	gag	gga	gcc	ttg	aat	aca	492
Asn	Lys	Glu	Gly	Ile	Val	Trp	Val	Ala	Thr	Glu	Gly	Ala	Leu	Asn	Thr	
			130					135					140			
ccc	aaa	gac	cac	att	ggc	acc	cgc	aat	cct	aat	aac	aat	gct	gcc	acc	540
Pro	Lys	Asp	His	Ile	Gly	Thr	Arg	Asn	Pro	Asn	Asn	Asn	Ala	Ala	Thr	
		145					150					155				
gtg	cta	caa	ctt	cct	caa	gga	aca	aca	ttg	cca	aaa	ggc	ttc	tac	gca	588
Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Pro	Lys	Gly	Phe	Tyr	Ala	
	160					165					170					
gag	gga	agc	aga	ggc	ggc	agt	caa	gcc	tct	tct	cgc	tcc	tca	tca	cgt	636
Glu	Gly	Ser	Arg	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	
175				180						185					190	
agt	cgc	ggt	aat	tca	aga	aat	tca	act	cct	ggc	agc	agt	agg	gga	aat	684
Ser	Arg	Gly	Asn	Ser	Arg	Asn	Ser	Thr	Pro	Gly	Ser	Ser	Arg	Gly	Asn	
				195					200					205		
tct	cct	gct	cga	atg	gct	agc	gga	ggt	ggt	gaa	act	gcc	ctc	gcg	cta	732
Ser	Pro	Ala	Arg	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Glu	Thr	Ala	Leu	Ala	Leu	
			210					215					220			
ttg	ctg	cta	gac	aga	ttg	aac	cag	ctt	gag	agc	aaa	gtt	tct	ggt	aaa	780
Leu	Leu	Leu	Asp	Arg	Leu	Asn	Gln	Leu	Glu	Ser	Lys	Val	Ser	Gly	Lys	
		225					230					235				
ggc	caa	caa	caa	caa	ggc	caa	act	gtc	act	aag	aaa	tct	gct	gct	gag	828
Gly	Gln	Gln	Gln	Gln	Gly	Gln	Thr	Val	Thr	Lys	Lys	Ser	Ala	Ala	Glu	
	240					245					250					
gca	tct	aaa	aag	cct	cgc	caa	aaa	cgt	act	gcc	aca	aaa	cag	tac	aac	876
Ala	Ser	Lys	Lys	Pro	Arg	Gln	Lys	Arg	Thr	Ala	Thr	Lys	Gln	Tyr	Asn	
255					260					265					270	

S226CAS111.ST25

gtc act caa gca ttt ggg aga cgt ggt cca gaa caa acc caa gga aat	924
Val Thr Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn	
275 280 285	
ttc ggg gac caa gac cta atc aga caa gga act gat tac aaa cat tgg	972
Phe Gly Asp Gln Asp Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp	
290 295 300	
ccg caa att gca caa ttt gct cca agt gcc tct gca ttc ttt gga atg	1020
Pro Gln Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met	
305 310 315	
tca cgc att ggc atg gaa gtc aca cct tcg gga aca tgg ctg act tat	1068
Ser Arg Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr	
320 325 330	
cat gga gcc att aaa ttg gat gac aaa gat cca caa ttc aaa gac aac	1116
His Gly Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Gln Phe Lys Asp Asn	
335 340 345 350	
gtc ata ctg ctg aac aag cac att gac gca tac aaa aca ttc cca cca	1164
Val Ile Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro	
355 360 365	
aca gag cct aaa aag gac aaa aag aaa aag act gat gaa gct cag cct	1212
Thr Glu Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Ala Gln Pro	
370 375 380	
ttg ccg cag aga caa aag aag cag ccc act gtg act ctt ctt cct gcg	1260
Leu Pro Gln Arg Gln Lys Lys Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala	
385 390 395	
gct gac atg gat gat ttc tcc aga caa ctt caa aat tcc atg agt gga	1308
Ala Asp Met Asp Asp Phe Ser Arg Gln Leu Gln Asn Ser Met Ser Gly	
400 405 410	
gct tct gct gat tca act cag gca taa acactcatga tgaccacaca	1355
Ala Ser Ala Asp Ser Thr Gln Ala	
415 420	
aggcagatgg gctatgtaaa cg	1377

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 422

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 37

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Ser Asn Gln Arg Ser Ala Pro Arg Ile  
1 5 10 15

Thr Phe Gly Gly Pro Thr Asp Ser Thr Asp Asn Asn Gln Asn Gly Gly  
20 25 30

Arg Asn Gly Ala Arg Pro Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn  
35 40 45

Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Glu  
Page 65

S226CAS111.ST25  
60

50

55

Leu Arg Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Val Arg  
 85 90 95  
 Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Glu Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ser Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys  
 115 120 125  
 Glu Gly Ile Val Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys  
 130 135 140  
 Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asn Ala Ala Thr Val Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly  
 165 170 175  
 Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg  
 180 185 190  
 Gly Asn Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Asn Ser Pro  
 195 200 205  
 Ala Arg Met Ala Ser Gly Gly Gly Glu Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu  
 210 215 220  
 Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Val Ser Gly Lys Gly Gln  
 225 230 235 240  
 Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser  
 245 250 255  
 Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Gln Tyr Asn Val Thr  
 260 265 270  
 Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly  
 275 280 285  
 Asp Gln Asp Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln  
 290 295 300  
 Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg  
 305 310 315 320  
 Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr His Gly

S226CAS111.ST25  
330

325

335

Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Gln Phe Lys Asp Asn Val Ile  
340 345 350Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu  
355 360 365Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Ala Gln Pro Leu Pro  
370 375 380Gln Arg Gln Lys Lys Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp  
385 390 395 400Met Asp Asp Phe Ser Arg Gln Leu Gln Asn Ser Met Ser Gly Ala Ser  
405 410 415Ala Asp Ser Thr Gln Ala  
420

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 1377

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 38  
 atgaagggtca ccaaactgct gcatttagag acgtacttgt tgttttaaataaacgaacaa 60  
 attaaatgt ctgataatgg accccaatca aaccaacgta gtgcccccg cattacattt 120  
 ggtggacca cagattcaac tgacaataac cagaatggag gacgcaatgg ggcaaggcca 180  
 aaacagcgcc gacccaagg tttacccaat aatactgcgt cttgggttcac agctctcact 240  
 cagcatggca aggaggaact tagattccct cgaggccagg gcgttccaat caacaccaat 300  
 agtgggtccag atgaccaaata tggctactac cgaagagcta cccgacgagt tcgtgggtgt 360  
 gacggcaaaa tgaaagagct cagccccaga tggtaacttct attacctagg aactggccca 420  
 gaagcttcac ttccctacgg cgctaacaaa gaaggcatcg tatgggttgc aactgagggga 480  
 gccttgaata cacccaaaga ccacattggc acccgcaatc ctaataacaa tgctgccacc 540  
 gtgctacaac ttctcaagg aacaacattg caaaaggct tctacgcaga gggaagcaga 600  
 ggcggcagtc aagcctcttc tcgctcctca tcacgtagtc gcggtaatc aagaaattca 660  
 actcctggca gcagtagggg aaattctcct gctcgaatgg ctagcggagg tggtgaaact 720  
 gccctcgcgc tattgtgtgt agacagattg aaccagcttg agagcaaagt ttctggtaaa 780  
 ggccaacaac aacaaggcca aactgtcact aagaaatctg ctgctgaggc atctaaaaag 840  
 cctcgccaaa aacgtactgc cacaaaacag tacaacgtca ctcaagcatt tgggagacgt 900

S226CAS111.ST25

```

gggtccagaac aaacccaagg aaatttcggg gaccaagacc taatcagaca aggaactgat    960
tacaaacatt ggccgcaaatt tgcacaattt gctccaagtg cctctgcatt ctttggaatg    1020
tcacgcattg gcatggaagt cacaccttcg ggaacatggc tgacttatca tggagccatt    1080
aaattggatg acaaagatcc acaattcaaa gacaacgtca tactgctgaa caagcacatt    1140
gacgcataca aaacattccc accaacagag cctaaaaagg acaaaaagaa aaagactgat    1200
gaagctcagc ctttgccgca gagacaaaag aagcagccca ctgtgactct tcttcctgcg    1260
gctgacatgg atgattttctc cagacaactt caaattcca tgagtggagc ttctgctgat    1320
tcaactcagg cataaacact catgatgacc acacaaggca gatgggctat gtaaacg      1377

```

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 204

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

```

<400> 39
atattaggtt tttacctacc caggaaaagc caaccaacct cgatctcttg tagatctggt    60
ctctaaacga actttaaaat ctgtgtagct gtcgctcggc tgcatgccta gtgcacctac    120
gcagtataaa caataataaa ttttactgtc gttgacaaga aacgagtaac tcgtccctct    180
tctgcagact gcttacgggt tcgt                                     204

```

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 809

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

```

<400> 40
actcaagcat ttgggagacg tgggtccagaa caaacccaag gaaatttcgg ggaccaagac    60
ctaatacagc aaggaactga ttacaaacat tggccgcaaa ttgcacaatt tgctccaagt    120
gcctctgcat tctttggaat gtcacgcatt ggcatggaag tcacaccttc ggggaacatgg    180
ctgacttatc atggagccat taaattggat gacaaagatc cacaattcaa agacaacgtc    240
atactgctga acaagcacat tgacgcatac aaaacattcc caccaacaga gcctaaaaag    300
gacaaaaaga aaaagactga tgaagctcag cttttgccgc agagacaaaa gaagcagccc    360
actgtgactc ttcttcctgc ggctgacatg gatgatttct ccagacaact tcaaaattcc    420
atgagtggag cttctgctga ttcaactcag gcataaacac tcatgatgac cacacaaggc    480
agatgggcta tgtaaactgt ttcgcaattc cgtttacgat acatagtcta ctcttgtgca    540
gaatgaattc tcgtaactaa acagcacaag taggtttagt taactttaat ctcacatagc    600

```

S226CAS111.ST25

aatctttaat caatgtgtaa cattagggag gacttgaaag agccaccaca ttttcatcga	660
ggccacgcgg agtacgatcg agggtagagt gaataatgct agggagagct gcctatatgg	720
aagagcccta atgtgtaaaa ttaatttttag tagtgctatc cccatgtgat tttaatagct	780
tcttaggaga atgacaaaaa aaaaaaaaaa	809

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 41		
aatgaacaca tagggctgtt caagctgggg cagtacgcct ttttccagct ctactagacc	60	
acaagtgccca tttttgaggt gttcacgtgc ctccgatagg gcctcttcca cagagtcccc	120	
gaagccacgc actagcacgt ctctaacctg aaggacaggc aaactgagtt ggacgtgtgt	180	
tttctcgttg acaccaagaa caaggctctc catcttacct ttcggtcaca cccggacgaa	240	
acctagggtat gctgatgatc gactgcaaca cggacgaaac cgtaagcagt ctgcagaaga	300	
gggacgagtt actcgtttct tgtcaacgac agtaaaatct attattgttt atactgcgta	360	
ggtgcactag gcatgcagcc gagcgacagc tacacagatt ttaaagttcg tttagagaac	420	
agatctacaa gagatcgagg ttggttgg	448	

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 2033

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 42		
atacctaggt ttcgtccggg tgtgaccgaa aggtaagatg gagagccttg ttcttggtgt	60	
caacgagaaa acacacgtcc aactcagttt gcctgtcctt caggtagag acgtgctagt	120	
gcgtggcttc ggggactctg tggaagaggc cctatcggag gcacgtgaac acctcaaaaa	180	
tggcacttgt ggtctagtag agctggaaaa aggcgtactg cccagcttg aacagcccta	240	
tgtgttcatt aaacgttctg atgccttaag caccaatcac ggccacaagg tcgttgagct	300	
ggttgacaaa atggacggca ttcagtacgg tcgtagcggg ataacactgg gagtactcgt	360	
gccacatgtg ggcgaaacct caattgcata ccgcaatgtt cttcttcgta agaacggtaa	420	
taaggagacc ggtggtcata gctatggcat cgatctaaag tcttatgact taggtgacga	480	
gcttggcact gatcccattg aagattatga acaaaactgg aacactaagc atggcagtg	540	
tgcactccgt gaactcactc gtgagctcaa tggagggtgca gtcactcgct atgtcgacaa	600	

## S226CAS111.ST25

caatttctgt ggcccagatg ggtaccctct tgattgcatc aaagattttc tcgcacgcgc 660  
 gggcaagtca atgtgcactc tttccgaaca acttgattac atcgagtcga agagaggtgt 720  
 ctactgctgc cgtgaccatg agcatgaaat tgcctggttc actgagcgct ctgataagag 780  
 ctacgagcac cagacaccct tcgaaattaa gagtgccaag aaatttgaca ctttcaaagg 840  
 ggaatgccca aagtttgtgt ttcctcttaa ctcaaaagtc aaagtcattc aaccacgtgt 900  
 tgaaaagaaa aagactgagg gtttcatggg gcgtatacgc tctgtgtacc ctgttgcac 960  
 tccacaggag tgtaacaata tgcacttgtc taccttgatg aaatgtaatc attgcatga 1020  
 agtttcatgg cagacgtgcg actttctgaa agccacttgt gaacattgtg gcactgaaaa 1080  
 tttagtatt gaaggaccta ctacatgtgg gtacctacct actaatgctg tagtgaaaat 1140  
 gccatgtcct gcctgtcaag acccagagat tggacctgag catagtgttg cagattatca 1200  
 caaccactca aacattgaaa ctcgactccg caagggagggt aggactagat gttttggagg 1260  
 ctgtgtgttt gcctatgttg gctgctataa taagcgtgcc tactgggttc ctcgtgctag 1320  
 tgctgatatt ggctcaggcc atactggcat tactggtgac aatgtggaga cttgaaatga 1380  
 ggatctcctt gagatactga gtcgtgaacg tggttaacatt aacattgttg gcgattttca 1440  
 tttgaatgaa gaggttgcca tcattttggc atctttctct gcttctacaa gtgcctttat 1500  
 tgacactata aagagtcttg attacaagtc tttcaaaacc attgttgagt cctgcggtaa 1560  
 ctataaagtt accaagggaa agcccgtaaa aggtgcttgg aacattggac aacagagatc 1620  
 agttttaaca cactgtgttg gttttccctc acaggctgct ggtgttatca gatcaatttt 1680  
 tgcgcgcaca cttgatgcag caaaccactc aattcctgat ttgcaaagag cagctgtcac 1740  
 catacttgat ggtatttctg aacagtcatt acgtcttgtc gacgccatgg tttatacttc 1800  
 agacctgtc accaacagtg tcattattat ggcataatgta actggtggtc ttgtacaaca 1860  
 gacttctcag tggttgtcta atcttttggg cactactgtt gaaaaactca ggcctatctt 1920  
 tgaatggatt gaggcgaaac ttagtgcagg agttgaattt ctcaaggatg cttgggagat 1980  
 tctcaaattt ctcatcacag gtgtttttga catcgtcaag ggtcaaatac agg 2033

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 2018

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 43

ggattgaggc gaaacttagt gcaggagttg aatttctcaa ggatgcttgg gagattctca 60  
 aatttctcat tacaggtgtt tttgacatcg tcaagggcca aatacagggt gcttcagata 120  
 acatcaagga ttgtgtaaaa tgcttcattg atgttggtta caaggcactc gaaatgtgca 180  
 ttgatcaagt cactatcgct ggcgcaaagt tgcgatcact caacttaggt gaagtcttca 240



## S226CAS111.ST25

tcgctcaaag caagggactt taccgtcagt gtatacgtgg caaggagcag ctgcaactac	300
tcatgcctct taaggcacca aaagaagtaa cctttcttga aggtgattca catgacacag	360
tacttacctc tgaggaggtt gttctcaaga acggtgaact cgaagcactc gagacgcccg	420
ttgatagctt cacaaatgga gctatcgttg gcacaccagt ctgtgtaaata ggccctcatgc	480
tcttagagat taaggacaaa gaacaatact gcgcattgtc tcctgggttta ctggctacaa	540
acaatgtctt tcgcttaaaa ggggggtgcac caattaaagg tgtaaccttt ggagaagata	600
ctgtttggga agttcaaggt tacaagaatg tgagaatcac atttgagctt gatgaacgtg	660
ttgacaaagt gcttaatgaa aagtgtcttg tctacactgt tgaatccggt accgaagtta	720
ctgagtttgc atgtgttgta gcagaggctg ttgtgaagac tttaacaacca gtttctgac	780
tccttaccaa catgggtatt gatcttgatg agtggagtgt agctacattc tactttatttg	840
atgatgctgg tgaagaaaac ttttcatcac gtatgtattg ttccttttac cctccagatg	900
aggaagaaga ggacgatgca gagtgtgagg aagaagaaat tgatgaaacc tgtgaacatg	960
agtacggtac agaggatgat tatcaaggtc tccctctgga atttggtgcc tcagctgaaa	1020
cagttcgagt tgaggaagaa gaagaggaag actggctgga tgatactact gagcaatcag	1080
agattgagcc agaaccagaa cctacacctg aagaaccagt taatcagttt actgggttatt	1140
taaaacttac tgacaatgtt gccattaaat gtgttgacat cgtaaggag gcaaaaagt	1200
ctaatacctat ggtgattgta aatgctgcta acatacacct gaaacatggt ggtggtgtag	1260
caggtgcact caacaaggca accaatggtg ccatgcaaaa ggagagtgat gattacatta	1320
agctaaatgg ccctcttaca gtaggaggggt cttgtttgct ttctggacat aatcttgcta	1380
agaagtgtct gcatgttggt ggacctaac taaatgcagg tgaggacatc cagcttctta	1440
aggcagcata tgaataatttc aattcacagg acatcttact tgcaccattg ttgtcagcag	1500
gcatatttgg tgctaaacca cttcagtcct tacaagtgtg cgtgcagacg gttcgtacac	1560
aggtttatat tgcagtcaat gacaaagctc tttatgagca ggttgatcat gattatcttg	1620
ataacctgaa gcctagagtg gaagcaccta aacaagagga gccaccaaac acagaagatt	1680
ccaaaactga ggagaaatct gtcgtacaga agcctgtcga tgtgaagcca aaaattaagg	1740
cctgcattga tgaggttacc acaacactgg aagaaactaa gtttcttacc aataagttac	1800
tcttggttgc tgatatcaat ggtaagcttt accatgattc tcagaacatg cttagagggtg	1860
aagatatgtc tttccttgag aaggatgcac cttacatggt aggtgatgtt atcactagt	1920
gtgatatac ttgtgttgta ataccctcca aaaaggctgg tggcactact gagatgctct	1980
caagagcttt gaagaaagtg ccagttgatg agtatata	2018

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 1442

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

S226CAS111.ST25

```

<400> 44
ttgatgaggt taccacaaca ctggaagaaa ctaagtttct taccaataag ttactcttgt      60
ttgctgatat caatggtaag ctttaccatg attctcagaa catgccttaga ggtgaagata      120
tgtcttttct tgagaaggat gcaccttaca tggtaggtga tggtatcact agtggtgata      180
tcacttgtgt tgtaataccc tccaaaaagg ctggtggcac tactgagatg ctctcaagag      240
ctttgaagaa agtgccagtt gatgagtata taaccacgta ccctggacaa ggatgtgctg      300
gttatacact tgaggaagct aagactgctc ttaagaaatg caaatctgca ttttatgtac      360
taccttcaga agcacctaag gctaaggaag agattctagg aactgtatcc tggaatttga      420
gagaaatgct tgctcatgct gaagagacaa gaaaattaat gcctatatgc atggatgtta      480
gagccataat ggcaaccatc caacgtaagt ataaaggaat taaaattcaa gagggcatcg      540
ttgactatgg tgtccgattc ttcttttata ctagtaaaga gcctgtagct tctattatta      600
cgaagctgaa ctctctaaat gagccgcttg tcacaatgcc aattgggttat gtgacacatg      660
gttttaaatct tgaagaggct gcgcgctgta tgcgttctct taaagctcct gccgtagtgt      720
cagtatcatc accagatgct gttactacat ataattggata cctcacttcg tcatcaaaga      780
catctgagga gcacttttga gaaacagttt ctttggctgg ctcttacaga gattggctct      840
attcaggaca gcgtacagag ttaggtgttg aatttcttaa gcgtgggtgac aaaattgtgt      900
accacactct ggagagcccc gtcgagtttc atcttgacgg tgaggttctt tcacttgaca      960
aactaaagag tctcttatcc ctgcgggagg ttaagactat aaaagtgttc acaactgtgg     1020
acaacactaa tctccacaca cagcttgtgg atatgtctat gacatatgga cagcagtttg     1080
gtccaacata cttggatggg gctgatgtta caaaaattaa acctcatgta aatcatgagg     1140
gtaagacttt ctttgtacta cctagtgatg acacactacg tagtgaagct ttcgagtact     1200
accatactct tgatgagagt tttcttggtg ggtacatgtc tgcttttaaac cacacaaaga     1260
aatggaaatt tcctcaagtt ggtggtttta cttcaattaa atgggctgat aacaattgtt     1320
atgtgtctag tgttttatta gcacttcaac agcttgaagt caaattcaat gcaccagcac     1380
ttcaagaggc ttattataga gcccgtgctg gtgatgctgc taacttttgt gcactcatac     1440
tc                                                                    1442

```

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 1050

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

```

<400> 45
atatgtctat gacatatgga cagcagtttg gtccaacata cttggatggg gctgatgtta      60

```

S226CAS111.ST25

```

- caaaaattaa acctcatgta aatcatgagg gtaagacttt ctttgtacta cctagtgatg 120
  acacactacg tagtgaagct ttcgagtact accatactct tgatgagagt tttcttggtg 180
  ggtacatgtc tgctttaaac cacacaaaga aatggaaatt tcctcaagtt ggtggtttta 240
  cttcaattaa atgggctgat aacaattggt atttgtctag tgttttatta gcacttcaac 300
  agcttgaagt caaattcaat gcaccagcac ttcaagaggc ttattataga gcccggtgctg 360
  gtgatgctgc taacttttgt gcactcatac tcgcttacag taataaaact gttggcgagc 420
  ttggtgatgt cagagaaact atgacccatc ttctacagca tgctaatttg gaatctgcaa 480
  agcgagttct taatgtggtg tgtaaacatt gtggtcagaa aactactacc ttaacgggtg 540
  tagaagctgt gatgtatatg ggtactctat cttatgataa tcttaagaca ggtgtttcca 600
  ttccatgtgt gtgtggctgt gatgctacac aatatctagt acaacaagag tcttcttttg 660
  ttatgatgtc tgcaccacct gctgagtata aattacagca aggtacattc ttatgtgcga 720
  atgagtacac tggttaactat cagtgtggct attacactca tataactgct aaggagaccc 780
  tctatcgtat tgacggagct caccttaca agatgtcaga gtacaaagga ccagtgactg 840
  atgttttcta caaggaaaca tcttacacta caaccatcaa gcctgtgtcg tataaactcg 900
  atggagttac ttacacagag attgaaccaa aattggatgg gtattataaa aaggataatg 960
  cttactatac agagcagcct atagaccttg taccaactca accattacca aatgcgagtt 1020
  ttgataattt caaactcaca tgttctaaca 1050

```

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 1995

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 46

```

tttgtgcact catactcgct tacagtaata aaactgttgg cgagcttggg gatgtcagag 60
aaactatgac ccatcttcta cagcatgcta atttggaatc tgcaaagcga gttcttaatg 120
tggtgtgtaa acattgtggg cagaaaacta ctaccttaac ggggtgtagaa gctgtgatgt 180
atatgggtac tctatcttat gataatctta agacaggtgt ttccattcca tgtgtgtgtg 240
gtcgtgatgc tacacaatat ctagtacaac aagagtcctt ttttgttatg atgtctgcac 300
cacctgctga gtataaatta cagcaaggta cattcttatg tgcgaatgag tacactggta 360
actatcagtg tggtcattac actcatataa ctgctaagga gaccctctat cgtattgacg 420
gagctcacct tacaagatg tcagagtaca aaggaccagt gactgatgtt ttctacaagg 480
aaacatctta cactacaacc atcaagcctg tgtcgtataa actcgatgga gttacttaca 540
cagagattga accaaaattg gatgggtatt ataaaaagga taatgcttac tatacagagc 600
agcctataga cttgtacca actcaaccat taccaaatgc gagttttgat aatttcaaac 660

```

## S226CAS111.ST25

```

tcacatgttc taacacaaaa tttgctgatg atttaaataca aatgacaggc ttcacaaagc 720
cagcttcacg agagctatct gtcacattct tcccagactt gaatggcgat gtagtggcta 780
ttgactatag acactattca gcgagtttca agaaagggtgc taaattactg cataagccaa 840
ttgtttggca cattaaccag gctacaacca agacaacgtt caaaccaaac acttggtggt 900
tacgttgtct ttggagtaca aagccagtag atacttcaaa ttcatttgaa gttctggcag 960
tagaagacac acaaggaatg gacaatcttg cttgtgaaag tcaacaaccc acctctgaag 1020
aagtagtgga aaatcctacc atacagaagg aagtcataga gtgtgacgtg aaaactaccg 1080
aagttgtagg caatgtcata cttaaaccat cagatgaagg tggttaaagta acacaagagt 1140
taggtcatga ggatcttatg gctgcttatg tggaaaacac aagcattacc attaagaaac 1200
ctaagagct ttcactagcc ttaggtttaa aaacaattgc cactcatggt attgctgcaa 1260
ttaatagtgt tccttgaggt aaaattttgg cttatgtcaa accattctta ggacaagcag 1320
caattacaac atcaaattgc gctaagagat tagcacaacg tgtgtttaac aattatatgc 1380
cttatgtgtt tacattattg ttccaattgt gtacttttac taaaagtacc aattctagaa 1440
ttagagcttc actacctaca actattgcta aaaatagtggt taagagtgtt gctaaattat 1500
gtttggatgc cggcattaat tatgtgaagt caccacaatt ttctaaattg ttcacaatcg 1560
ctatgtggct attgttggtta agtatttgct taggttctct aatctgtgta actgctgctt 1620
ttggtgtact cttatctaata tttggtgctc cttcttattg taatggcggt agagaattgt 1680
atcttaattc gtctaacgtt actactatgg atttctgtga aggttctttt cttgcagca 1740
tttgtttaag tggattagac tcccttgatt cttatccagc tcttgaaacc attcagggtga 1800
cgatttcacg gtacaagcta gacttgacaa ttttaggtct ggccgctgag tgggttttgg 1860
catatatgtt gttcacaaaa ttcttttatt tattaggtct ttcagctata atgcagggtg 1920
tctttggcta ttttgctagt catttcatca gcaattcttg gctcatgtgg tttatcatta 1980
gtattgtaca aatgg 1995

```

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 1884

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 47

```

aattcttggc tcatgtgggt tatcattagt attgtacaaa tggcaccctg ttctgcaatg 60
gtaggatgt acatcttctt tgcttctttc tactacatat ggaagagcta tgttcatatc 120
atggatgggt gcacctcttc gacttgcatg atgtgctata agcgcaatcg tgccacacgc 180
gttgagtgt caactattgt taatggcatg aagagatctt tctatgtcta tgcaaatgga 240
ggccgtggct tctgcaagac tcacaattgg aattgtctca attgtgacac attttgcact 300

```

S226CAS111.ST25

```

ggtagtacat tcattagtga tgaagttgct cgtgatttgt cactccagtt taaaagacca 360
atcaacccta ctgaccagtc atcgtatatatt gttgatagtg ttgctgtgaa aaatggcgcg 420
cttcacctct acttttgacaa ggctgggtcaa aagacctatg agagacatcc gctctcccat 480
tttgtcaatt tagacaattt gagagctaac aacactaaag gttcactgcc tattaatgtc 540
atagtttttg atggcaagtc caaatgcgac gagtctgctt ctaagtctgc ttctgtgtac 600
tacagtcagc tgatgtgcca acctattctg ttgcttgacc aagctcttgt atcagacgtt 660
ggagatagta ctgaagtttc cgtaaagatg tttgatgctt atgtcgacac cttttcagca 720
acttttagtg ttcctatgga aaaacttaag gcacttggtt ctacagctca cagcgagtta 780
gcaaagggtg tagcttttaga tgggtgcctt tctacattcg tgtcagctgc cgcacaaggt 840
gttgttgata ccgatgttga cacaaggat gttattgaat gtctcaaact ttcacatcac 900
tctgacttag aagtgcagag tgacagttgt aacaatttca tgctcaccta taataagggt 960
gaaaacatga cgccagaga tcttggcgca tgtattgact gtaatgcaag gcatatcaat 1020
gccaagtag caaaaagtca caatgtttca ctcatctgga atgtaaaaga ctacatgtct 1080
ttatctgaac agctgcgtaa acaaattcgt agtgctgcca agaagaaca catacctttt 1140
agactaactt gtgctacaac tagacagggt gtcaatgtca taactactaa aatctcactc 1200
aagggtggta agattgtag tacttgtttt aaacttatgc ttaaggccac attattgtgc 1260
gttcttgctg cattggtttg ttatatcggt atgccagtag atacattgtc aatccatgat 1320
ggttacacaa atgaaatcat tggttacaaa gccattcagg atgggtgtcac tcgtgacatc 1380
atttctactg atgattgttt tgcaataaaa catgctgggt ttgacgcatg gtttagccag 1440
cgtgggtggt catacaaaaa tgacaaaagc tgccctgtag tagctgctat cattacaaga 1500
gagattgggt tcatagtgcc tggcttaccg ggtactgtgc tgagagcaat caatggtgac 1560
ttcttgcat tttctacctcg tgtttttagt gctgttgga acatttgcta cacaccttcc 1620
aaactcattg agtatagtga ttttgctacc tctgcttgcg ttcttgctgc tgagtgtaca 1680
atttttaagg atgctatggg caaacctgtg ccatattgtt atgacactaa tttgctagag 1740
ggttctatct cttatagtga gcttcgtcca gacactcggt atgtgcttat ggatgggtcc 1800
atcacacagt ttcctaacac ttacctggag ggttctgtta gagtagtaac aacttttgat 1860
gctgagtact gtagacatgg taca 1884

```

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 2020

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 48

cactcgttat gtgcttatgg atggttccat catacagttt cctaacactt acctggaggg 60

S226CAS111.ST25

ttctgttaga gtagtaacaa cttttgatgc tgagtactgt agacatggta catgcgaaag	120
gtcagaagta ggtatttgcc tatctaccag tggtagatgg gttcttaata atgagcatta	180
cagagctcta tcaggagttt tctgtggtgt tgatgcatg aatctcatag ctaacatctt	240
tactcctctt gtgcaacctg tgggtgcttt agatgtgtct gcttcagtag tggctggtgg	300
tattattgcc atattggtga cttgtgctgc ctactacttt atgaaattca gacgtgtttt	360
tggtgagtac aaccatgttg ttgctgctaa tgcacttttg tttttgatgt ctttcactat	420
actctgtctg gtaccagctt acagctttct gccgggagtc tactcagtct tttacttgta	480
cttgacattc tatttcacca atgatgtttc attcttggtc caccttcaat ggtttgccat	540
gttttctcct attgtgcctt tttggataac agcaatctat gtattctgta tttctctgaa	600
gcaactgccat tggttcttta acaactatct taggaaaaga gtcattgtta atggagttac	660
atttagtacc ttcgaggagg ctgctttgtg tacctttttg ctcaacaagg aaatgtacct	720
aaaattgctg agcgagacac tgttgccact tacacagtat aacaggatc ttgctctata	780
taacaagtac aagtatttca gtggagcctt agatactacc agctatcgtg aagcagcttg	840
ctgccactta gcaaaggctc taaatgactt tagcaactca ggtgctgatg ttctctacca	900
accaccacag acatcaatca cttctgctgt tctgcagagt ggtttagga aaatggcatt	960
cccgtcaggc aaagttgaag ggtgcatggg acaagtaacc tgtggaacta caactcttaa	1020
tggattgtgg ttggatgaca cagtatactg tccaagacat gtcatttgca cagcagaaga	1080
catgcttaat cctaactatg aagatctgct cattcgcaaa tccaaccata gctttcttgt	1140
tcaggctggc aatgttcaac ttcgtgttat tggccattct atgcaaaatt gtctgcttag	1200
gcttaaagtt gatacttcta accctaagac acccaagtat aaatttgtcc gtatccaacc	1260
tgggtcaaca ttttcagttc tagcatgcta caatggttca ccatctgggtg tttatcagtg	1320
tgccatgaga cctaatacata ccattaaagg ttctttcctt aatggatcat gtggtagtgt	1380
tggttttaac attgattatg attgctgtgc tttctgctat atgcatcata tggagcttcc	1440
aacaggagta cacgctggta ctgacttaga aggtaaattc tatgggtccat ttgttgacag	1500
acaaactgca caggctgcag gtacagacac aaccataaca ttaaattgttt tggcatggct	1560
gtatgctgct gttatcaatg gtgatagggt gtttcttaat agattcacca ctactttgaa	1620
tgactttaac cttgtggcaa tgaagtacaa ctatgaacct ttgacacaag atcatgttga	1680
catattggga cctctttctg ctcaaacagg aattgccgtc ttagatatgt gtgctgcttt	1740
gaaagagctg ctgcagaatg gtatgaatgg tcgtactatc cttggtagca ctattttaga	1800
agatgagttt acaccatttg atgttggttag acaatgctct ggtgttacct tccaaggtaa	1860
gttcaagaaa attgttaagg gcactcatca ttggatgctt ttaactttct tgacatcact	1920
attgattctt gttcaaagta cacagtgggc actgtttttc tttgtttacg agaatgcttt	1980
cttgccattt actcttggtg ttatggcaat tgctgcatgt	2020

## S226CAS111.ST25

&lt;211&gt; 2040

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

&lt;400&gt; 49

```

agcattttcca gcctgaagac gtactgtagc agctaaactg cccagcacca tacctctatt      60
taggttggtt aagcctttga tgaagtacaa gtatttcact ttaggccctt ttggtgtgtc      120
tgtaacaaac ctacaagggt gttccagttc tgtgtaaatt gtacctgtac catcactctt      180
agggaatcta gcccatttga gatcttggtg gtctgatagt aatgccagca caaacctacc      240
tcccttcgaa ttgttatagt aggcaagtgc attgtcatca gtacaagctg tttgtgtggt      300
accagccgca caggacatct gtcgtagtgc tactggactc agttcattat tctgtagttt      360
aacagctgag ttggctctta gagctgtaac aataagaggc caagccaaat ttggtgaatt      420
gtccatgtta atttcactaa gttgaacaat cttgctatcc gcatcaaaa cttgctggat      480
ttcccagagt gcagatgcat atgtaaaggt gttaccatca caagtgttct tgtaggtacc      540
ataatcaggg acaacaacca tgagtttggc tgctgtagtc aatggatga tgttgagtgg      600
aacacaacca tcacgcgcat tgttgataat gttgttaagt gcatcattat caagcttcct      660
aagcatagtg aagagcattg tttgcatagc actagttact tttgccctct tgtcctcaga      720
tcttgccctgt ttgtacattt gggtcatagc ctgatctgcc atcttttcca acttgcggtg      780
catggcagca tcacggtcaa actcagattt agccacattc aaagatttct ttaacttttt      840
gagaacgact tcagaatcac cattagctac agcctgctca taggcctcct gggcagtggc      900
ataagcggca tatgatggta aagaactaaa ttctgaagca atagcctgaa gagtagcacg      960
gttatcgagc atttcctcgc acaacctatt aatgtctaca gcacctgca tggatagcaa     1020
aacagacaaa agagaaacca tcttctcgaa agcttcagtt gtgtcttttg caagaagaat     1080
atcattgtgg agttgtacac attgtgcca caatttagaa gatgactcta ctctaagttg     1140
ttgaagaacc gagagcagta ccacagatgt gcactttacg tcagacattt tagactgtac     1200
agtagcaacc ttgatacatg gtttacctcc aatacccaac aacttaatgt taagcttgaa     1260
agcatcaata ctactcttag gaggcaaaag cccctgggag ttcataatac taaattcttg     1320
tgtagagacc aagtagtcat aaacaccaag agtaagcctg aagtaacggg tgagtaaaca     1380
gaaaaggcca aagtagcagc agcaacaata gcctaagaaa caataaaca gcatgataca     1440
ctgtaaggty ttgccagtaa taaataaaaa tgggtaatac tcaacacaca caaacactat     1500
agctctagct aaaaacatga tagtcgtaac gacaccagaa tagttagagg ttacagaaat     1560
aactaaggcc cacatggaaa tagcttgatc taaagcatta ccatagtaga ctttgtaaac     1620
aagtgtaatg acattcatca gtgtccaaac acgtctagca gcatcatcat aaacagtgcg     1680
agctgtcatg agaataagca aaactaaagc tgaagcatac ataacacaat ccttaagcct     1740

```

S226CAS111.ST25

ataaccagac aagctagtgt cagccaattc aagccatgtc atgatacgca tcacccagct	1800
agcaggcatg tagaccatat taaagtaagc aactgttgca agagaaggta acagaaacaa	1860
gcacaagaat gcgtgcttat gcttaacaag cagcatagca catgcagcaa ttgccataat	1920
accaagagta aatggcaaga aagcattctc gtaaacaag aaaaacagtg accactgtgt	1980
actttgaaca agaatacaata gtgatgtcaa gaaagttaaa agcatccaat gatgagtgc	2040

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 2012

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 50	
cttgtagggtt tgttacagac acacaaaag ggcctaaagt gaaatacttg tacttcatca	60
aaggcttaaa caacctaaat agaggatatg tgctgggcag tttagctgct acagtacgtc	120
ttcaggctgg aatgctaca gaagtacctg ccaattcaac tgtgctttcc ttctgtgctt	180
ttgcagtaga ccctgctaaa gcatataagg attacctagc aagtggagga caaccaatca	240
ccaactgtgt gaagatgttg tgtacacaca ctggtacagg acaggcaatt actgtaacac	300
cagaagctaa catggaccaa gagtcctttg gtggtgcttc atgttgctctg tattgtagat	360
gccacattga ccatccaaat cctaaaggat tctgtgactt gaaaggtaag tacgtccaaa	420
tacctaccac ttgtgctaata gaccagtggt gttttacact tagaaacaca gtctgtaccg	480
tctgcggaat gtggaaagggt tatggctgta gttgtgacca actccgcgaa cccttgatgc	540
agtctgcgga tgcataacg tttttaacg ggtttgcggt gtaagtgcag cccgtcttac	600
accgtgcggc acaggcacta gtactgatgt cgtctacagg gcttttgata ttacaacga	660
aaaagttgct ggttttgcaa agttcctaaa aactaattgc tgtcgcttcc aggagaagga	720
tgaggaaggc aatttattag actcttactt tgtagttaag aggcatacta tgtctaacta	780
ccaacatgaa gagactattht ataacttgggt taaagattgt ccagcggttg ctgtccatga	840
ctttttcaag tttagagtag atggtgacat ggtaccacat atatcacgtc agcgtctaac	900
taaatacaca atggctgatt tagtctatgc tctacgtcat tttgatgagg gtaattgtga	960
tacattaaaa gaaatactcg tcacatacaa ttgctgtgat gatgattatt tcaataagaa	1020
ggattggtat gacttcgtag agaatcctga catcttacgc gtatatgcta acttaggtga	1080
gcgtgtacgc caatcattat taaagactgt acaattctgc gatgctatgc gtgatgcagg	1140
cattgtaggc gtactgacat tagataatca ggatcttaat ggggaactgggt acgatttcgg	1200
tgatttcgta caagtagcac caggctgcgg agttcctatt gtggattcat attactcatt	1260
gctgatgcc atcctcactt tgactagggc attggctgct gagtcccata tggatgctga	1320
tctcgcaaaa ccacttatta agtgggattt gctgaaatat gattttacgg aagagagact	1380



## S226CAS111.ST25

ttgtctcttc gaccgttatt ttaaattattg ggaccagaca taccatccca attgtattaa	1440
ctgtttggat gatagggtga tccttcattg tgcaaacttt aatgtgttat tttctactgt	1500
gtttccacct acaagttttg gaccactagt aagaaaaata tttgtagatg gtgttccttt	1560
tgttgtttca actggatacc attttcgtga gttaggagtc gtacataatc aggatgtaaa	1620
cttacatagc tcgcgtctca gtttcaagga acttttagtg tatgctgctg atccagctat	1680
gcatgcagct tctggcaatt tattgctaga taaacgcact acatgctttt cagtagctgc	1740
actaacaac aatgttgctt ttcaaactgt caaacccggt aattttaata aagactttta	1800
tgactttgct gtgtctaaag gtttctttaa ggaaggaagt tctgttgaac taaaacactt	1860
cttctttgct caggatggca acgctgctat cagtgattat gactattatc gttataatct	1920
gccacaatg tgtgatatca gacaactcct attcgtagtt gaagttgttg ataaatactt	1980
tgattgttac gatggtggct gtattaatgc ca	2012

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 1877

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 51	
gtacttcgcg tacagtggca ataccatatg acagcttaaa tgtttcctca gtggctttga	60
gcgtttctgc tgcgaaaagc ttgagtcctc cagtacaagt gttggcaagt atgtaatcgc	120
cagcattagt ccaatcacat gttgctatcg cattgaagtc agtgacattg tcaactgccta	180
cacatgtgtt tttgtataaa ccaaaaacct gaccattagc acataatgga aaactaatgg	240
gaggcttatg tgacttgcaa taatagctca tacctcctag atacagttgt gtcacatcag	300
tgacatcaca acctggggca ttgcaaact agggattaac agacaacact aatttggtg	360
atgttgaaat gacatggtca tagcagcact tgcaacatag gaatggtctc ctaatacagg	420
caccgcaacg aagtgaagtc tgtgaattgc acaatacaca agcacctaca gcctgcaaga	480
ctgtatgtgg tgtgtacata gcctcataaa actcaggttc ccagtaccgt gaggtgttat	540
cattagttag cattacggaa tacatgtcca acatgtggcc agtaagctca tcatgtaact	600
ttctaattgta ttgtaaatac aagtgaaaga catcagcata ctctgatta ggatgttttg	660
taagtgggta agcatcaata gccagtgaca cgaacctttc aatcataagt gtaccatctg	720
ttttgacaat atcatcgaca aaacagcctg cgcctaatat tcttgatgga tctgggtaag	780
gcaggtacac gtaatcatct ccttgtttaa ctagcattgt atgctgtgag caaaattcgt	840
gaggtccttt agtaaggta gtctcagtc aacattttgc ctgagacatg aacacattat	900
tttgataata aagaactgcc ttaaagttct taatgctagc tactaaacct tgagccgcat	960
agttactgtt atagcacaca acggcatcat cagaaagaat catcatggag aaatgtttac	1020

S226CAS111.ST25

gcaggttaagc gtaaaactca tccacgaatt catgatcaac atccctat	ctatagagac	1080
actcatagag cctgtgttgt agattgcgga catacttgct agctatctta ttaccatcag		1140
ttgaaagaag tgcattttaca ttggctgtaa cagcttgaca aatgttaaag acactattag		1200
cataagcagt tgtagcatca ccggatgatg ttccacctgg tttaacatat agtgagccgc		1260
cacacatgac catctcactt aatacttgcg cacactcgtt agctaacctg tagaaacggt		1320
gtgataagtt acagcaagtg ttatgtttgc gagcaagaac aagagaggcc attatcctaa		1380
gcatgttagg catggctctg tcacattttg gataatccca acccataagg tgtggagttt		1440
ctacatcact gtaaacagtt tttaacatat tatgccagcc accgtaaac ttgcttgctc		1500
caattaccac agtagctcct ctagtggcgg ctattgactt caataatttc tgatgaaact		1560
gtctattttgt catagtacta cagatagaga caccagctac ggtgcgagct ctattctttg		1620
cactaatggc atacttaaga ttcatttgag ttatagtagg gatgacatta cgcttagtat		1680
acgcgaaaag tgcattctga tcctcataac tcattgagtc ataataaagt ctagccttac		1740
cccatttatt aaatgggaaa ccagctgatt tatccagatt gttaacgatt acttggttgg		1800
cattaataca gccaccatcg taacaatcaa agtattttatc aacaacttca actacgaata		1860
ggagttgtct gatatca		1877

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 2051

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 52		
tcagggtccaa tcttgacaaa gtacttcatt gatgtaagct caaagccatg cgcccaaagg		60
acgaacacga ctctgtctga caatcctttc agtgtatcac tgagcatttg tactatctta		120
atacgacta cattccaggg caagccttta tacatgagtg gtataagatg tttaaactgg		180
tcacctgggtg gaggttttgc attaaactctg gtgaattctg tgttattttc agtgtcaaca		240
taaccagtcg gtacagctac taagttaaca cctgtagaaa atcctagctg gagaggtagg		300
ttagtaccca cagcatctct agttgcatga cagccctcta catcaaagcc aatccacgca		360
cgaacgtgac gaatagcttc ttcgcgggtg ataaacatat tagggtaacc attgacttgg		420
taattcattt tgaaacccat catagagatg agtctacggg aggtcatgtc ctttggtatg		480
cctgggtatgt caacacataa tccttcagtc ttgaaacttta tatcaacgct gaggtgtgta		540
ggtgcctgtg taggatgaag accagtaatg atcttactac agtccttaaa aagtccagtt		600
acattttctg cttgtaatgt agccacattg cgacgtggta tttctagact tgtaaattgc		660
agtttgtcat aaagatctct atcagacatt atgcacaaaa tgccaatttt tgcccttggtg		720
atagccacat tgaagcgggt gacattacaa gagtgtgctg tttcagtagt ttgtgtgaat		780

S226CAS111.ST25

atgacatagt catattcaga accctgtgat gaatcaacag tctgcgtagg caatcctaag	840
atTTTTgaag ctacagcggt ctgtgaatta taagggtgaga taaaaacagc ttttctccaa	900
gcaggattgc gtgtaagaaa ttctcttaca acgcctatTT gaggtctgtt gattgcagat	960
gaaacatcat gtgtaataac acctttgtag aacattttga agcattgagc tgacttatcc	1020
ttgtgtgctt ttagcttatt gtcataaact aaagcactca cagtgtcaac aatttcagca	1080
ggacaacggc gacaagttcc aaggaacatg tctggaccta ttgttttcat aagtctgcac	1140
actgaattaa aatattctgg ttctagtgtg cttttagtca gcaatgtgcg gggggctggt	1200
aattgagcag gatcgccaat atagacgtag tgTTTTgcac gaagtctagc attgacaaca	1260
ctcaagtcac aattagtagc catagagatt tcatcaaaga ctacaatgtc agcagttgtt	1320
tctggcaatg catttacagt gcagaaaaca tactgttcta gtgttgaatt cactttgaat	1380
ttatcaaaac actctacgcg cgcacgcgca ggtatgattc tactacattt atctatgggc	1440
aaatatTTTta atgccttttc acatagggca tcaacagctg catgagagca tgccgtatac	1500
actatgcgag cagatgggta atagagagca agtccgatgg caaaatgact cttaccagta	1560
ccagggtggc cttggagtgt agagtacttt tgcatgccga ccttttgata atttgcaaca	1620
ttgctagaaa actcatctga gatgttgagt gttgggtaca agccagtaat tctcacatag	1680
tgctcttgtg gcactagagt aggtgcacta agtggcatta cagtgtgaga tgtcaacaca	1740
aagtaatcac caacattcaa cttgtatgtc gtagtacctc tgtacacaac agcatcacca	1800
tagtcacctt tttcaaaggt gtactctcca atctgtactt tactattttt agttacacgg	1860
taaccagtaa agacatagtt tctgttcaat ggtggtctag gttttccaac ctcccatgaa	1920
agatgcaatt ctctgtcaga gagtacttcg cgtacagtgg caataccata tgacagctta	1980
aatgtttcct cagtggcttt gagcgtttct gctgcgaaaa gcttgagtct ctcagtacaa	2040
gtgttggcaa g	2051

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 2075

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

<400> 53	
tgctttagt tttgggtaga aggtttcaac atgtccatcc ttacaccaa gcatgaatga	60
aatttcagca tagtcaattg taaccttgac cacttttgaa atcactgaca aatcttgtga	120
ctttattatc tcgacaaagt catcaagtaa aagatcaatc acagaacaca cacattttga	180
tgaacctgtt tgcgcatctg ttatgaagta atttttcact gtgctgtcca tagggataaa	240
atcctcta at ttaagtgggtg aatcttgtga gcgcttggct aagcctatca ttaa atgaag	300
accgccaagt tgtccatgac tgaaatctcc ataaacgatg tgttcgaagg catagccctc	360

S226CAS111.ST25

gagcttatat	cgctgtatga	attcatccat	agcgagctcg	agaaagtcag	tttccatttg	420
tgatctgggc	ttaaaatcct	ctaagtctct	gctctgagta	aagtaggttt	caggcaactg	480
ttgaataatg	ccgtctactt	tcttaaagta	gttaaactgt	gtttttactg	attctccaat	540
taatgtgact	ccattgacgc	tagcttgtgc	tgggtccctt	gaagggtgta	gacctttgac	600
tgaaccttct	gttattaaaa	caccattacg	ggcgtttcta	aaaagggtcta	cctgtccttc	660
cactctacca	tcaaacaaga	cagtaagtga	agaacaagca	ctctcagtag	gtttcttggc	720
aatgtcagtc	attgtgcaga	cacctattgt	agatacatgt	gctggggcct	ctcttttgta	780
gtcccagatt	acagtattag	cagcgatata	aacacccaaa	ttattgagta	tcttaatctc	840
tggcactggt	ttaatgttac	gcttagccca	aagctcaa	gcaacattaa	caggaagtgt	900
tgtcttattt	tcaaagatct	ccacatcaat	accatctacc	tttgtgtaaa	cagcattatt	960
aatgatggaa	acaggtgctt	cgccggcggt	tccatcaaag	tgtcctttat	taacaacatt	1020
ataagccaca	ttttctaaac	tctgtaacct	ggtaaagtga	ttccacaggt	tataagtatc	1080
aaattgtttg	taaatccata	ggctaaatcc	agcagaaatc	atcatattat	atgcatccaa	1140
gtactgtcgg	tactcatttg	catggtgtct	gcaaacagca	ccacctaaat	tgcacgtgt	1200
aatacacgta	gcagatttga	gtggaacata	atcaatatcc	gacactactt	gtttgccatg	1260
agactcacia	ggactatcag	aatagtaaaa	gaaaggcaat	tgctttaaat	tagtaaatgc	1320
acttttatcg	aaagctggag	tgtggaatgc	atgcttattc	acatacaaac	taccaccatc	1380
acagcctggt	aagttcaagt	ttgacaagac	tcttgtgtca	aacctacaca	caattgcatt	1440
ggctgggtaa	cgatcaacgt	tacaattcca	aaacaaacaa	acaccatcag	tgaatttatc	1500
gtgatgtgta	gcataagaat	agaagagttc	ctctattttg	taagctttgt	cactacatgg	1560
ctgagcatcg	tagaacttcc	attctacttc	agcctgaggg	acacacttga	tagcctttgg	1620
atttccaatg	tcatgaagaa	ctggaaactt	atcagcaagc	aatgcagact	tcacaaccat	1680
gtgttgact	tttctgcaag	cagaattaac	cctcagttca	tctcctataa	taggggtattc	1740
aacagaccaa	tcaacgcgct	taacaaagca	ctcatggact	gctaaacatc	tagtcatgat	1800
agcatcacia	ctagccacat	gtgcatttcc	atgtacctgg	caatgttggg	catggttact	1860
ctgaagggtta	cccgtaaagc	cccactgctg	aacatcaatc	ataaatgggt	tatagacata	1920
gtcaaaaacc	acagaatgat	tccagcaggc	ataagtatct	gatgaagtag	aaaagcaagt	1980
tgcacgtttg	tcacacagac	aacacgttct	ttcagggtcca	atcttgacaa	agtacttcat	2040
tgatgtaagc	tcaaagccat	gcgcccacaa	gacga			2075

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 1891

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

## S226CAS111.ST25

<400> 54  
aagattcacc acttaaatta gaggatttta tccctatgga cagcacagtg aaaaattact 60  
tcataacaga tgcgcaaaca ggttcatcaa aatgtgtgtg ttctgtgatt gatcttttac 120  
ttgatgactt tgtcgagata ataaagtcac aagatttgtc agtgatttca aaagtgggtca 180  
aggttacaat tgactatgct gaaatttcat tcatgctttg gtgtaaggat ggacatgttg 240  
aaaccttcta cccaaaacta caagcaagtc aagcgtggca accagggtgtt gcgatgccta 300  
acttgtacaa gatgcaaaga atgcttcttg aaaagtgtga ccttcagaat tatgggtgaaa 360  
atgctgttat accaaaagga ataatgatga atgtcgcaaa gtataactcaa ctgtgtcaat 420  
acttaaatac acttacttta gctgtaccct acaacatgag agttattcac tttgggtgctg 480  
gctctgataa aggagttgca ccagggtacag ctgtgctcag acaatgggtg ccaactggca 540  
cactacttgt cgattcagat cttaatgact tcgtctccga cgcagattct actttaattg 600  
gagactgtgc aacagtacat acggctaata aatgggacct tattattagc gatatgtatg 660  
accctaggac caaacatgtg acaaaagaga atgactctaa agaagggttt ttcacttatc 720  
tgtgtggatt tataaagcaa aaactagccc tgggtgggtc tatagctgta aagataacag 780  
agcattcttg gaatgctgac ctttacaagc ttatgggcca tttctcatgg tggacagctt 840  
ttgttacaaa tgtaaatgca tcatcatcgg aagcattttt aattggggct aactatcttg 900  
gcaagccgaa ggaacaaatt gatggctata ccatgcatgc taactacatt ttctggagga 960  
acacaaatcc tatccagttg tcttcctatt cactctttga catgagcaaa tttcctctta 1020  
aattaagagg aactgctgta atgtctctta aggagaatca aatcaatgat atgatttatt 1080  
ctcttctgga aaaaggtagg cttatcatta gagaaaacaa cagagttgtg gtttcaagtg 1140  
atattcttgt taacaactaa acgaacatgt ttattttctt attatttctt actctcacta 1200  
gtggtagtga ccttgaccgg tgcaccactt ttgatgatgt tcaagctcct aattacactc 1260  
aacatacttc atctatgagg ggggtttact atcctgatga aatttttaga tcagacactc 1320  
tttatttaac tcaggattta tttcttccat tttattctaa tgttacaggg tttcatacta 1380  
ttaatcatac gtttggcaac cctgtcatac cttttaagga tggattttat tttgctgcca 1440  
cagagaaatc aaatgttgct cgtgggtggg tttttgggtc taccatgaac aacaagtcac 1500  
agtcggtgat tattattaac aattctacta atgttggtat acgagcatgt aactttgaat 1560  
tgtgtgacaa cccttctttt gctgtttcta aacccatggg tacacagaca catactatga 1620  
tattcgataa tgcatttaat tgcactttcg agtacatatc tgatgccttt tcgcttgatg 1680  
tttcagaaaa gtcaggtaat tttaaacact tacgagagtt tgtgttttaa aataaagatg 1740  
ggtttctcta tgtttataag ggctatcaac ctatagatgt agttcgtgat ctaccttctg 1800  
gttttaacac tttgaaacct atttttaagt tgcctcttgg tattaacatt acaaatttta 1860  
gagccattct tacagccttt tcacctgctc a 1891

&lt;210&gt; 55

## S226CAS111.ST25

<211> 32

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<220>

<223> amorce N sens

<400> 55

cccatatgtc tgataatgga cccaatcaa ac

32

<210> 56

<211> 32

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce N antisens

<400> 56

cccccggtg cctgagttga atcagcagaa gc

32

<210> 57

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce Sc sens

<400> 57

cccatatgag tgaccttgac cggtgcacca c

31

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce SL sens

<400> 58

cccatatgaa accttgcacc ccacctgctc S226CAS111.ST25 30

<210> 59

<211> 33

<212> DNA

<213> amorce Sc et SL antisens

<400> 59  
cccccggtt taatatattg ctcataattt ccc 33

<210> 60

<211> 16

<212> DNA

<213> amorce sens série 1

<400> 60  
ggcatcgtat gggttg 16

<210> 61

<211> 16

<212> DNA

<213> amorce antisens série 2 (28774-28759)

<400> 61  
cagtttcacc acctcc 16

<210> 62

<211> 16

<212> DNA

<213> amorce sens série 2 (28375-28390)

<400> 62  
ggctactacc gaagag 16

<210> 63

<211> 16

<212> DNA

<213> amorce antisens série 2 (28702-28687)

## S226CAS111.ST25

<400> 63  
aattaccgcg actacg 16

<210> 64

<211> 26

<212> DNA

<213> sonde 1/série 1 (28561-28586)

<400> 64  
ggcaccgcga atcctaataa caatgc 26

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> sonde 2/série 1 (28588-28608)

<400> 65  
gccaccgtgc tacaacttcc t 21

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> sonde 1/série 2 /sonde N/FL (28541-28563)

<400> 66  
atacacccaa agaccacatt ggc 23

<210> 67

<211> 25

<212> DNA

<213> sonde 2/série 2/sonde SARS/N/LC705 (28565-28589)

<400> 67  
cccgcaatcc taataacaat gctgc 25

<210> 68

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence



S226CAS111.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce ancre 14T

&lt;400&gt; 68

agatgaattc ggtacctttt tttttttttt

30

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; peptide M2-14

&lt;400&gt; 69

Ala Asp Asn Gly Thr Ile Thr Val Glu Glu Leu Lys Gln  
1 5 10

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; peptide E1-12

&lt;400&gt; 70

Met Tyr Ser Phe Val Ser Glu Glu Thr Gly Thr Leu  
1 5 10

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; peptide E53-72

&lt;400&gt; 71

Lys Pro Thr Val Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn Leu Asn Ser Ser  
Page 87

1 5 S226CAS111.ST25 15  
10

Glu Gly Val Pro Asp Leu Leu Val  
20

<210> 72

<211> 153

<212> DNA

<213> CORONAVIRUS

<400> 72  
gatattaggt ttttacctac ccaggaaaag ccaaccaacc tcgatctctt gtagatctgt 60  
tctctaaacg aacttttaaaa tctgtgtagc tgtcgctcgg ctgcatgcct agtgcaccta 120  
cgcagtataa acaataataa attttactgt cgt 153

<210> 73

<211> 410

<212> DNA

<213> CORONAVIRUS

<400> 73  
ttctccagac aacttcaaaa ttccatgagt ggagcttctg ctgattcaac tcaggcataa 60  
aactcatga tgaccacaca aggcagatgg gctatgtaaa cgttttcgca attccgttta 120  
cgatacatag tctactcttg tgcagaatga attctcgtaa ctaaacagca caagtagggt 180  
tagttaactt taatctcaca tagcaatctt taatcaatgt gtaacattag ggaggacttg 240  
aaagagccac cacattttca tcgaggccac gcggagtacg atcgagggta cagtgaataa 300  
tgctagggag agctgcctat atggaagagc cctaattgtgt aaaattaatt ttagtagtgc 360  
tatcccatg tgattttaat agcttcttag gagaatgaca aaaaaaaaaa 410

<210> 74

<211> 4382

<212> PRT

<213> CORONAVIRUS

<400> 74

Met Glu Ser Leu Val Leu Gly Val Asn Glu Lys Thr His Val Gln Leu  
1 5 10 15

Ser Leu Pro Val Leu Gln Val Arg Asp Val Leu Val Arg Gly Phe Gly  
Page 88

Page 89

S226CAS111.ST25  
300

290

295

Pro Val Ala Ser Pro Gln Glu Cys Asn Asn Met His Leu Ser Thr Leu  
305 310 315 320

Met Lys Cys Asn His Cys Asp Glu Val Ser Trp Gln Thr Cys Asp Phe  
325 330 335

Leu Lys Ala Thr Cys Glu His Cys Gly Thr Glu Asn Leu Val Ile Glu  
340 345 350

Gly Pro Thr Thr Cys Gly Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Val Val Lys Met  
355 360 365

Pro Cys Pro Ala Cys Gln Asp Pro Glu Ile Gly Pro Glu His Ser Val  
370 375 380

Ala Asp Tyr His Asn His Ser Asn Ile Glu Thr Arg Leu Arg Lys Gly  
385 390 395 400

Gly Arg Thr Arg Cys Phe Gly Gly Cys Val Phe Ala Tyr Val Gly Cys  
405 410 415

Tyr Asn Lys Arg Ala Tyr Trp Val Pro Arg Ala Ser Ala Asp Ile Gly  
420 425 430

Ser Gly His Thr Gly Ile Thr Gly Asp Asn Val Glu Thr Leu Asn Glu  
435 440 445

Asp Leu Leu Glu Ile Leu Ser Arg Glu Arg Val Asn Ile Asn Ile Val  
450 455 460

Gly Asp Phe His Leu Asn Glu Glu Val Ala Ile Ile Leu Ala Ser Phe  
465 470 475 480

Ser Ala Ser Thr Ser Ala Phe Ile Asp Thr Ile Lys Ser Leu Asp Tyr  
485 490 495

Lys Ser Phe Lys Thr Ile Val Glu Ser Cys Gly Asn Tyr Lys Val Thr  
500 505 510

Lys Gly Lys Pro Val Lys Gly Ala Trp Asn Ile Gly Gln Gln Arg Ser  
515 520 525

Val Leu Thr Pro Leu Cys Gly Phe Pro Ser Gln Ala Ala Gly Val Ile  
530 535 540

Arg Ser Ile Phe Ala Arg Thr Leu Asp Ala Ala Asn His Ser Ile Pro  
545 550 555 560

Asp Leu Gln Arg Ala Ala Val Thr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Glu Gln  
Page 90

S226CAS111.ST25  
570

565

575

Ser Leu Arg Leu Val Asp Ala Met Val Tyr Thr Ser Asp Leu Leu Thr  
 580 585 590

Asn Ser Val Ile Ile Met Ala Tyr Val Thr Gly Gly Leu Val Gln Gln  
 595 600 605

Thr Ser Gln Trp Leu Ser Asn Leu Leu Gly Thr Thr Val Glu Lys Leu  
 610 615 620

Arg Pro Ile Phe Glu Trp Ile Glu Ala Lys Leu Ser Ala Gly Val Glu  
 625 630 635 640

Phe Leu Lys Asp Ala Trp Glu Ile Leu Lys Phe Leu Ile Thr Gly Val  
 645 650 655

Phe Asp Ile Val Lys Gly Gln Ile Gln Val Ala Ser Asp Asn Ile Lys  
 660 665 670

Asp Cys Val Lys Cys Phe Ile Asp Val Val Asn Lys Ala Leu Glu Met  
 675 680 685

Cys Ile Asp Gln Val Thr Ile Ala Gly Ala Lys Leu Arg Ser Leu Asn  
 690 695 700

Leu Gly Glu Val Phe Ile Ala Gln Ser Lys Gly Leu Tyr Arg Gln Cys  
 705 710 715 720

Ile Arg Gly Lys Glu Gln Leu Gln Leu Leu Met Pro Leu Lys Ala Pro  
 725 730 735

Lys Glu Val Thr Phe Leu Glu Gly Asp Ser His Asp Thr Val Leu Thr  
 740 745 750

Ser Glu Glu Val Val Leu Lys Asn Gly Glu Leu Glu Ala Leu Glu Thr  
 755 760 765

Pro Val Asp Ser Phe Thr Asn Gly Ala Ile Val Gly Thr Pro Val Cys  
 770 775 780

Val Asn Gly Leu Met Leu Leu Glu Ile Lys Asp Lys Glu Gln Tyr Cys  
 785 790 795 800

Ala Leu Ser Pro Gly Leu Leu Ala Thr Asn Asn Val Phe Arg Leu Lys  
 805 810 815

Gly Gly Ala Pro Ile Lys Gly Val Thr Phe Gly Glu Asp Thr Val Trp  
 820 825 830

Glu Val Gln Gly Tyr Lys Asn Val Arg Ile Thr Phe Glu Leu Asp Glu

S226CAS111.ST25

835                      840                      845  
 Arg Val Asp Lys Val Leu Asn Glu Lys Cys Ser Val Tyr Thr Val Glu  
 850                      855                      860  
 Ser Gly Thr Glu Val Thr Glu Phe Ala Cys Val Val Ala Glu Ala Val  
 865                      870                      875                      880  
 Val Lys Thr Leu Gln Pro Val Ser Asp Leu Leu Thr Asn Met Gly Ile  
 885                      890                      895  
 Asp Leu Asp Glu Trp Ser Val Ala Thr Phe Tyr Leu Phe Asp Asp Ala  
 900                      905  
 Gly Glu Glu Asn Phe Ser Ser Arg Met Tyr Cys Ser Phe Tyr Pro Pro  
 915                      920                      925  
 Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Ala Glu Cys Glu Glu Glu Ile Asp  
 930                      935                      940  
 Glu Thr Cys Glu His Glu Tyr Gly Thr Glu Asp Asp Tyr Gln Gly Leu  
 945                      950                      955                      960  
 Pro Leu Glu Phe Gly Ala Ser Ala Glu Thr Val Arg Val Glu Glu Glu  
 965                      970                      975  
 Glu Glu Glu Asp Trp Leu Asp Asp Thr Thr Glu Gln Ser Glu Ile Glu  
 980                      985                      990  
 Pro Glu Pro Glu Pro Thr Pro Glu Glu Pro Val Asn Gln Phe Thr Gly  
 995                      1000                      1005  
 Tyr Leu Lys Leu Thr Asp Asn Val Ala Ile Lys Cys Val Asp Ile  
 1010                      1015                      1020  
 Val Lys Glu Ala Gln Ser Ala Asn Pro Met Val Ile Val Asn Ala  
 1025                      1030                      1035  
 Ala Asn Ile His Leu Lys His Gly Gly Gly Val Ala Gly Ala Leu  
 1040                      1045                      1050  
 Asn Lys Ala Thr Asn Gly Ala Met Gln Lys Glu Ser Asp Asp Tyr  
 1055                      1060                      1065  
 Ile Lys Leu Asn Gly Pro Leu Thr Val Gly Gly Ser Cys Leu Leu  
 1070                      1075                      1080  
 Ser Gly His Asn Leu Ala Lys Lys Cys Leu His Val Val Gly Pro  
 1085                      1090                      1095  
 Asn Leu Asn Ala Gly Glu Asp Ile Gln Leu Leu Lys Ala Ala Tyr  
 1100                      1105                      1110

S226CAS111.ST25

1100		1105	1110
Glu Asn Phe Asn Ser Gln Asp Ile Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser	1115	1120	1125
Ala Gly Ile Phe Gly Ala Lys Pro Leu Gln Ser Leu Gln Val Cys	1130	1135	1140
Val Gln Thr Val Arg Thr Gln Val Tyr Ile Ala Val Asn Asp Lys	1145	1150	1155
Ala Leu Tyr Glu Gln Val Val Met Asp Tyr Leu Asp Asn Leu Lys	1160	1165	1170
Pro Arg Val Glu Ala Pro Lys Gln Glu Glu Pro Pro Asn Thr Glu	1175	1180	1185
Asp Ser Lys Thr Glu Glu Lys Ser Val Val Gln Lys Pro Val Asp	1190	1195	1200
Val Lys Pro Lys Ile Lys Ala Cys Ile Asp Glu Val Thr Thr Thr	1205	1210	1215
Leu Glu Glu Thr Lys Phe Leu Thr Asn Lys Leu Leu Leu Phe Ala	1220	1225	1230
Asp Ile Asn Gly Lys Leu Tyr His Asp Ser Gln Asn Met Leu Arg	1235	1240	1245
Gly Glu Asp Met Ser Phe Leu Glu Lys Asp Ala Pro Tyr Met Val	1250	1255	1260
Gly Asp Val Ile Thr Ser Gly Asp Ile Thr Cys Val Val Ile Pro	1265	1270	1275
Ser Lys Lys Ala Gly Gly Thr Thr Glu Met Leu Ser Arg Ala Leu	1280	1285	1290
Lys Lys Val Pro Val Asp Glu Tyr Ile Thr Thr Tyr Pro Gly Gln	1295	1300	1305
Gly Cys Ala Gly Tyr Thr Leu Glu Glu Ala Lys Thr Ala Leu Lys	1310	1315	1320
Lys Cys Lys Ser Ala Phe Tyr Val Leu Pro Ser Glu Ala Pro Asn	1325	1330	1335
Ala Lys Glu Glu Ile Leu Gly Thr Val Ser Trp Asn Leu Arg Glu	1340	1345	1350
Met Leu Ala His Ala Glu Glu Thr Arg Lys Leu Met Pro Ile Cys			

S226CAS111.ST25  
1365

1355

1360

Met Asp Val Arg Ala Ile Met Ala Thr Ile Gln Arg Lys Tyr Lys  
 1370 1375 1380

Gly Ile Lys Ile Gln Glu Gly Ile Val Asp Tyr Gly Val Arg Phe  
 1385 1390 1395

Phe Phe Tyr Thr Ser Lys Glu Pro Val Ala Ser Ile Ile Thr Lys  
 1400 1405 1410

Leu Asn Ser Leu Asn Glu Pro Leu Val Thr Met Pro Ile Gly Tyr  
 1415 1420 1425

Val Thr His Gly Phe Asn Leu Glu Glu Ala Ala Arg Cys Met Arg  
 1430 1435 1440

Ser Leu Lys Ala Pro Ala Val Val Ser Val Ser Ser Pro Asp Ala  
 1445 1450 1455

Val Thr Thr Tyr Asn Gly Tyr Leu Thr Ser Ser Ser Lys Thr Ser  
 1460 1465 1470

Glu Glu His Phe Val Glu Thr Val Ser Leu Ala Gly Ser Tyr Arg  
 1475 1480 1485

Asp Trp Ser Tyr Ser Gly Gln Arg Thr Glu Leu Gly Val Glu Phe  
 1490 1495 1500

Leu Lys Arg Gly Asp Lys Ile Val Tyr His Thr Leu Glu Ser Pro  
 1505 1510 1515

Val Glu Phe His Leu Asp Gly Glu Val Leu Ser Leu Asp Lys Leu  
 1520 1525 1530

Lys Ser Leu Leu Ser Leu Arg Glu Val Lys Thr Ile Lys Val Phe  
 1535 1540 1545

Thr Thr Val Asp Asn Thr Asn Leu His Thr Gln Leu Val Asp Met  
 1550 1555 1560

Ser Met Thr Tyr Gly Gln Gln Phe Gly Pro Thr Tyr Leu Asp Gly  
 1565 1570 1575

Ala Asp Val Thr Lys Ile Lys Pro His Val Asn His Glu Gly Lys  
 1580 1585 1590

Thr Phe Phe Val Leu Pro Ser Asp Asp Thr Leu Arg Ser Glu Ala  
 1595 1600 1605

Phe Glu Tyr Tyr His Thr Leu Asp Glu Ser Phe Leu Gly Arg Tyr



S226CAS111.ST25  
1620

1610 1615 1620  
 Met Ser Ala Leu Asn His Thr Lys Lys Trp Lys Phe Pro Gln Val  
 1625 1630 1635  
 Gly Gly Leu Thr Ser Ile Lys Trp Ala Asp Asn Asn Cys Tyr Leu  
 1640 1645 1650  
 Ser Ser Val Leu Leu Ala Leu Gln Gln Leu Glu Val Lys Phe Asn  
 1655 1660 1665  
 Ala Pro Ala Leu Gln Glu Ala Tyr Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Asp  
 1670 1675 1680  
 Ala Ala Asn Phe Cys Ala Leu Ile Leu Ala Tyr Ser Asn Lys Thr  
 1685 1690 1695  
 Val Gly Glu Leu Gly Asp Val Arg Glu Thr Met Thr His Leu Leu  
 1700 1705 1710  
 Gln His Ala Asn Leu Glu Ser Ala Lys Arg Val Leu Asn Val Val  
 1715 1720 1725  
 Cys Lys His Cys Gly Gln Lys Thr Thr Thr Leu Thr Gly Val Glu  
 1730 1735 1740  
 Ala Val Met Tyr Met Gly Thr Leu Ser Tyr Asp Asn Leu Lys Thr  
 1745 1750 1755  
 Gly Val Ser Ile Pro Cys Val Cys Gly Arg Asp Ala Thr Gln Tyr  
 1760 1765 1770  
 Leu Val Gln Gln Glu Ser Ser Phe Val Met Met Ser Ala Pro Pro  
 1775 1780 1785  
 Ala Glu Tyr Lys Leu Gln Gln Gly Thr Phe Leu Cys Ala Asn Glu  
 1790 1795 1800  
 Tyr Thr Gly Asn Tyr Gln Cys Gly His Tyr Thr His Ile Thr Ala  
 1805 1810 1815  
 Lys Glu Thr Leu Tyr Arg Ile Asp Gly Ala His Leu Thr Lys Met  
 1820 1825 1830  
 Ser Glu Tyr Lys Gly Pro Val Thr Asp Val Phe Tyr Lys Glu Thr  
 1835 1840 1845  
 Ser Tyr Thr Thr Thr Ile Lys Pro Val ser Tyr Lys Leu Asp Gly  
 1850 1855 1860  
 Val Thr Tyr Thr Glu Ile Glu Pro Lys Leu Asp Gly Tyr Tyr Lys

S226CAS111.ST25

1865		1870		1875	
Lys Asp 1880	Asn Ala Tyr Tyr	Thr 1885	Glu Gln Pro Ile	Asp 1890	Leu Val Pro
Thr Gln 1895	Pro Leu Pro Asn	Ala 1900	Ser Phe Asp Asn	Phe 1905	Lys Leu Thr
Cys Ser 1910	Asn Thr Lys Phe	Ala 1915	Asp Asp Leu Asn	Gln 1920	Met Thr Gly
Phe Thr 1925	Lys Pro Ala Ser	Arg 1930	Glu Leu Ser Val	Thr 1935	Phe Phe Pro
Asp Leu 1940	Asn Gly Asp Val	Val 1945	Ala Ile Asp Tyr	Arg 1950	His Tyr Ser
Ala Ser 1955	Phe Lys Lys Gly	Ala 1960	Lys Leu Leu His	Lys 1965	Pro Ile Val
Trp His 1970	Ile Asn Gln Ala	Thr 1975	Thr Lys Thr Thr	Phe 1980	Lys Pro Asn
Thr Trp 1985	Cys Leu Arg Cys	Leu 1990	Trp Ser Thr Lys	Pro 1995	Val Asp Thr
Ser Asn 2000	Ser Phe Glu Val	Leu 2005	Ala Val Glu Asp	Thr 2010	Gln Gly Met
Asp Asn 2015	Leu Ala Cys Glu	Ser 2020	Gln Gln Pro Thr	Ser 2025	Glu Glu Val
Val Glu 2030	Asn Pro Thr Ile	Gln 2035	Lys Glu Val Ile	Glu 2040	Cys Asp Val
Lys Thr 2045	Thr Glu Val Val	Gly 2050	Asn Val Ile Leu	Lys 2055	Pro Ser Asp
Glu Gly 2060	Val Lys Val Thr	Gln 2065	Glu Leu Gly His	Glu 2070	Asp Leu Met
Ala Ala 2075	Tyr Val Glu Asn	Thr 2080	Ser Ile Thr Ile	Lys 2085	Lys Pro Asn
Glu Leu 2090	Ser Leu Ala Leu	Gly 2095	Leu Lys Thr Ile	Ala 2100	Thr His Gly
Ile Ala 2105	Ala Ile Asn Ser	Val 2110	Pro Trp Ser Lys	Ile 2115	Leu Ala Tyr
Val Lys	Pro Phe Leu Gly	Gln	Ala Ala Ile Thr Thr	Ser Asn Cys	

S226CAS111.ST25

2120		2125		2130
Ala Lys	Arg Leu Ala Gln	Arg Val Phe Asn Asn	Tyr Met Pro Tyr	
2135		2140	2145	
Val Phe	Thr Leu Leu Phe	Gln Leu Cys Thr Phe	Thr Lys Ser Thr	
2150		2155	2160	
Asn Ser	Arg Ile Arg Ala	Ser Leu Pro Thr Thr	Ile Ala Lys Asn	
2165		2170	2175	
Ser Val	Lys Ser Val Ala	Lys Leu Cys Leu Asp	Ala Gly Ile Asn	
2180		2185	2190	
Tyr Val	Lys Ser Pro Lys	Phe Ser Lys Leu Phe	Thr Ile Ala Met	
2195		2200	2205	
Trp Leu	Leu Leu Leu Ser	Ile Cys Leu Gly Ser	Leu Ile Cys Val	
2210		2215	2220	
Thr Ala	Ala Phe Gly Val	Leu Leu Ser Asn Phe	Gly Ala Pro Ser	
2225		2230	2235	
Tyr Cys	Asn Gly Val Arg	Glu Leu Tyr Leu Asn	Ser Ser Asn Val	
2240		2245	2250	
Thr Thr	Met Asp Phe Cys	Glu Gly Ser Phe Pro	Cys Ser Ile Cys	
2255		2260	2265	
Leu Ser	Gly Leu Asp Ser	Leu Asp Ser Tyr Pro	Ala Leu Glu Thr	
2270		2275	2280	
Ile Gln	Val Thr Ile Ser	Ser Tyr Lys Leu Asp	Leu Thr Ile Leu	
2285		2290	2295	
Gly Leu	Ala Ala Glu Trp	Val Leu Ala Tyr Met	Leu Phe Thr Lys	
2300		2305	2310	
Phe Phe	Tyr Leu Leu Gly	Leu Ser Ala Ile Met	Gln Val Phe Phe	
2315		2320	2325	
Gly Tyr	Phe Ala Ser His	Phe Ile Ser Asn Ser	Trp Leu Met Trp	
2330		2335	2340	
Phe Ile	Ile Ser Ile Val	Gln Met Ala Pro Val	Ser Ala Met Val	
2345		2350	2355	
Arg Met	Tyr Ile Phe Phe	Ala Ser Phe Tyr Tyr	Ile Trp Lys Ser	
2360		2365	2370	
Tyr Val	His Ile Met Asp	Gly Cys Thr Ser Ser	Thr Cys Met Met	

S226CAS111.ST25  
2385

2375 2380  
 Cys Tyr Lys Arg Asn Arg Ala Thr Arg Val Glu Cys Thr Thr Ile  
 2390 2395 2400  
 Val Asn Gly Met Lys Arg Ser Phe Tyr Val Tyr Ala Asn Gly Gly  
 2405 2410 2415  
 Arg Gly Phe Cys Lys Thr His Asn Trp Asn Cys Leu Asn Cys Asp  
 2420 2425 2430  
 Thr Phe Cys Thr Gly Ser Thr Phe Ile Ser Asp Glu Val Ala Arg  
 2435 2440 2445  
 Asp Leu Ser Leu Gln Phe Lys Arg Pro Ile Asn Pro Thr Asp Gln  
 2450 2455 2460  
 Ser Ser Tyr Ile Val Asp Ser Val Ala Val Lys Asn Gly Ala Leu  
 2465 2470 2475  
 His Leu Tyr Phe Asp Lys Ala Gly Gln Lys Thr Tyr Glu Arg His  
 2480 2485 2490  
 Pro Leu Ser His Phe Val Asn Leu Asp Asn Leu Arg Ala Asn Asn  
 2495 2500 2505  
 Thr Lys Gly Ser Leu Pro Ile Asn Val Ile Val Phe Asp Gly Lys  
 2510 2515 2520  
 Ser Lys Cys Asp Glu Ser Ala Ser Lys Ser Ala Ser Val Tyr Tyr  
 2525 2530 2535  
 Ser Gln Leu Met Cys Gln Pro Ile Leu Leu Leu Asp Gln Ala Leu  
 2540 2545 2550  
 Val Ser Asp Val Gly Asp Ser Thr Glu Val Ser Val Lys Met Phe  
 2555 2560 2565  
 Asp Ala Tyr Val Asp Thr Phe Ser Ala Thr Phe Ser Val Pro Met  
 2570 2575 2580  
 Glu Lys Leu Lys Ala Leu Val Ala Thr Ala His Ser Glu Leu Ala  
 2585 2590 2595  
 Lys Gly Val Ala Leu Asp Gly Val Leu Ser Thr Phe Val Ser Ala  
 2600 2605 2610  
 Ala Arg Gln Gly Val Val Asp Thr Asp Val Asp Thr Lys Asp Val  
 2615 2620 2625  
 Ile Glu Cys Leu Lys Leu Ser His His Ser Asp Leu Glu Val Thr

S226CAS111.ST25

2630		2635		2640
Gly Asp 2645	Ser Cys Asn Asn	Phe 2650	Met Leu Thr Tyr	Asn 2655
Asn Met 2660	Thr Pro Arg Asp	Leu 2665	Gly Ala Cys Ile	Asp 2670
Arg His 2675	Ile Asn Ala Gln	Val 2680	Ala Lys Ser His	Asn 2685
Ile Trp 2690	Asn Val Lys Asp	Tyr 2695	Met Ser Leu Ser	Glu 2700
Lys Gln 2705	Ile Arg Ser Ala	Ala 2710	Lys Lys Asn Asn	Ile 2715
Leu Thr 2720	Cys Ala Thr Thr	Arg 2725	Gln Val Val Asn	Val 2730
Lys Ile 2735	Ser Leu Lys Gly	Gly 2740	Lys Ile Val Ser	Thr 2745
Leu Met 2750	Leu Lys Ala Thr	Leu 2755	Leu Cys Val Leu	Ala 2760
Cys Tyr 2765	Ile Val Met Pro	Val 2770	His Thr Leu Ser	Ile 2775
Tyr Thr 2780	Asn Glu Ile Ile	Gly 2785	Tyr Lys Ala Ile	Gln 2790
Thr Arg 2795	Asp Ile Ile Ser	Thr 2800	Asp Asp Cys Phe	Ala 2805
Ala Gly 2810	Phe Asp Ala Trp	Phe 2815	Ser Gln Arg Gly	Gly 2820
Asn Asp 2825	Lys Ser Cys Pro	Val 2830	Val Ala Ala Ile	Ile 2835
Ile Gly 2840	Phe Ile Val Pro	Gly 2845	Leu Pro Gly Thr	Val 2850
Ile Asn 2855	Gly Asp Phe Leu	His 2860	Phe Leu Pro Arg	Val 2865
Val Gly 2870	Asn Ile Cys Tyr	Thr 2875	Pro Ser Lys Leu	Ile 2880
Asp Phe	Ala Thr Ser Ala Cys	Val Leu Ala Ala	Glu Cys Thr Ile	

S226CAS111.ST25  
2895

2885					2890					2895				
Phe	Lys 2900	Asp	Ala	Met	Gly	Lys 2905	Pro	Val	Pro	Tyr	Cys 2910	Tyr	Asp	Thr
Asn	Leu 2915	Leu	Glu	Gly	Ser	Ile 2920	Ser	Tyr	Ser	Glu	Leu 2925	Arg	Pro	Asp
Thr	Arg 2930	Tyr	Val	Leu	Met	Asp 2935	Gly	Ser	Ile	Ile	Gln 2940	Phe	Pro	Asn
Thr	Tyr 2945	Leu	Glu	Gly	Ser	Val 2950	Arg	Val	Val	Thr	Thr 2955	Phe	Asp	Ala
Glu	Tyr 2960	Cys	Arg	His	Gly	Thr 2965	Cys	Glu	Arg	Ser	Glu 2970	Val	Gly	Ile
Cys	Leu 2975	Ser	Thr	Ser	Gly	Arg 2980	Trp	Val	Leu	Asn	Asn 2985	Glu	His	Tyr
Arg	Ala 2990	Leu	Ser	Gly	Val	Phe 2995	Cys	Gly	Val	Asp	Ala 3000	Met	Asn	Leu
Ile	Ala 3005	Asn	Ile	Phe	Thr	Pro 3010	Leu	Val	Gln	Pro	Val 3015	Gly	Ala	Leu
Asp	Val 3020	Ser	Ala	Ser	Val	Val 3025	Ala	Gly	Gly	Ile	Ile 3030	Ala	Ile	Leu
Val	Thr 3035	Cys	Ala	Ala	Tyr	Tyr 3040	Phe	Met	Lys	Phe	Arg 3045	Arg	Val	Phe
Gly	Glu 3050	Tyr	Asn	His	Val	Val 3055	Ala	Ala	Asn	Ala	Leu 3060	Leu	Phe	Leu
Met	Ser 3065	Phe	Thr	Ile	Leu	Cys 3070	Leu	Val	Pro	Ala	Tyr 3075	Ser	Phe	Leu
Pro	Gly 3080	Val	Tyr	Ser	Val	Phe 3085	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Thr 3090	Phe	Tyr	Phe
Thr	Asn 3095	Asp	Val	Ser	Phe	Leu 3100	Ala	His	Leu	Gln	Trp 3105	Phe	Ala	Met
Phe	Ser 3110	Pro	Ile	Val	Pro	Phe 3115	Trp	Ile	Thr	Ala	Ile 3120	Tyr	Val	Phe
Cys	Ile 3125	Ser	Leu	Lys	His	Cys 3130	His	Trp	Phe	Phe	Asn 3135	Asn	Tyr	Leu
Arg	Lys	Arg	Val	Met	Phe	Asn	Gly	Val	Thr	Phe	Ser	Thr	Phe	Glu

S226CAS111.ST25

3140		3145		3150	
Glu Ala	Ala Leu Cys Thr	Phe	Leu Leu Asn Lys	Glu	Met Tyr Leu
3155		3160		3165	
Lys Leu	Arg Ser Glu Thr	Leu	Leu Pro Leu Thr	Gln	Tyr Asn Arg
3170		3175		3180	
Tyr Leu	Ala Leu Tyr Asn	Lys	Tyr Lys Tyr Phe	Ser	Gly Ala Leu
3185		3190		3195	
Asp Thr	Thr Ser Tyr Arg	Glu	Ala Ala Cys Cys	His	Leu Ala Lys
3200		3205		3210	
Ala Leu	Asn Asp Phe Ser	Asn	Ser Gly Ala Asp	Val	Leu Tyr Gln
3215		3220		3225	
Pro Pro	Gln Thr Ser Ile	Thr	Ser Ala Val Leu	Gln	Ser Gly Phe
3230		3235		3240	
Arg Lys	Met Ala Phe Pro	Ser	Gly Lys Val Glu	Gly	Cys Met Val
3245		3250		3255	
Gln Val	Thr Cys Gly Thr	Thr	Thr Leu Asn Gly	Leu	Trp Leu Asp
3260		3265		3270	
Asp Thr	Val Tyr Cys Pro	Arg	His Val Ile Cys	Thr	Ala Glu Asp
3275		3280		3285	
Met Leu	Asn Pro Asn Tyr	Glu	Asp Leu Leu Ile	Arg	Lys Ser Asn
3290		3295		3300	
His Ser	Phe Leu Val Gln	Ala	Gly Asn Val Gln	Leu	Arg Val Ile
3305		3310		3315	
Gly His	Ser Met Gln Asn	Cys	Leu Leu Arg Leu	Lys	Val Asp Thr
3320		3325		3330	
Ser Asn	Pro Lys Thr Pro	Lys	Tyr Lys Phe Val	Arg	Ile Gln Pro
3335		3340		3345	
Gly Gln	Thr Phe Ser Val	Leu	Ala Cys Tyr Asn	Gly	Ser Pro Ser
3350		3355		3360	
Gly Val	Tyr Gln Cys Ala	Met	Arg Pro Asn His	Thr	Ile Lys Gly
3365		3370		3375	
Ser Phe	Leu Asn Gly Ser	Cys	Gly Ser Val Gly	Phe	Asn Ile Asp
3380		3385		3390	
Tyr Asp	Cys Val Ser Phe	Cys	Tyr Met His His	Met	Glu Leu Pro

S226CAS111.ST25

3395						3400						3405
Thr	Gly	Val	His	Ala	Gly	Thr	Asp	Leu	Glu	Gly	Lys	Phe Tyr Gly
3410						3415					3420	
Pro	Phe	Val	Asp	Arg	Gln	Thr	Ala	Gln	Ala	Ala	Gly	Thr Asp Thr
3425						3430					3435	
Thr	Ile	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Ala	Trp	Leu	Tyr	Ala	Ala Val Ile
3440						3445					3450	
Asn	Gly	Asp	Arg	Trp	Phe	Leu	Asn	Arg	Phe	Thr	Thr	Thr Leu Asn
3455						3460					3465	
Asp	Phe	Asn	Leu	Val	Ala	Met	Lys	Tyr	Asn	Tyr	Glu	Pro Leu Thr
3470						3475					3480	
Gln	Asp	His	Val	Asp	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Ser	Ala	Gln Thr Gly
3485						3490					3495	
Ile	Ala	Val	Leu	Asp	Met	Cys	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Leu Leu Gln
3500						3505					3510	
Asn	Gly	Met	Asn	Gly	Arg	Thr	Ile	Leu	Gly	Ser	Thr	Ile Leu Glu
3515						3520					3525	
Asp	Glu	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	Val	Val	Arg	Gln	Cys	Ser Gly Val
3530						3535					3540	
Thr	Phe	Gln	Gly	Lys	Phe	Lys	Lys	Ile	Val	Lys	Gly	Thr His His
3545						3550					3555	
Trp	Met	Leu	Leu	Thr	Phe	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu Val Gln
3560						3565					3570	
Ser	Thr	Gln	Trp	Ser	Leu	Phe	Phe	Phe	Val	Tyr	Glu	Asn Ala Phe
3575						3580					3585	
Leu	Pro	Phe	Thr	Leu	Gly	Ile	Met	Ala	Ile	Ala	Ala	Cys Ala Met
3590						3595					3600	
Leu	Leu	Val	Lys	His	Lys	His	Ala	Phe	Leu	Cys	Leu	Phe Leu Leu
3605						3610					3615	
Pro	Ser	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Tyr	Phe	Asn	Met	Val	Tyr Met Pro
3620						3625					3630	
Ala	Ser	Trp	Val	Met	Arg	Ile	Met	Thr	Trp	Leu	Glu	Leu Ala Asp
3635						3640					3645	
Thr	Ser	Leu	Ser	Gly	Tyr	Arg	Leu	Lys	Asp	Cys	Val	Met Tyr Ala



S226CAS111.ST25  
3660

3650 3655  
 Ser Ala Leu Val Leu Leu Ile Leu Met Thr Ala Arg Thr Val Tyr  
 3665 3670 3675  
 Asp Asp Ala Ala Arg Arg Val Trp Thr Leu Met Asn Val Ile Thr  
 3680 3685 3690  
 Leu Val Tyr Lys Val Tyr Tyr Gly Asn Ala Leu Asp Gln Ala Ile  
 3695 3700 3705  
 Ser Met Trp Ala Leu Val Ile Ser Val Thr Ser Asn Tyr Ser Gly  
 3710 3715 3720  
 Val Val Thr Thr Ile Met Phe Leu Ala Arg Ala Ile Val Phe Val  
 3725 3730 3735  
 Cys Val Glu Tyr Tyr Pro Leu Leu Phe Ile Thr Gly Asn Thr Leu  
 3740 3745 3750  
 Gln Cys Ile Met Leu Val Tyr Cys Phe Leu Gly Tyr Cys Cys Cys  
 3755 3760 3765  
 Cys Tyr Phe Gly Leu Phe Cys Leu Leu Asn Arg Tyr Phe Arg Leu  
 3770 3775 3780  
 Thr Leu Gly Val Tyr Asp Tyr Leu Val Ser Thr Gln Glu Phe Arg  
 3785 3790 3795  
 Tyr Met Asn Ser Gln Gly Leu Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ile Asp  
 3800 3805 3810  
 Ala Phe Lys Leu Asn Ile Lys Leu Leu Gly Ile Gly Gly Lys Pro  
 3815 3820 3825  
 Cys Ile Lys Val Ala Thr Val Gln Ser Lys Met Ser Asp Val Lys  
 3830 3835 3840  
 Cys Thr Ser Val Val Leu Leu Ser Val Leu Gln Gln Leu Arg Val  
 3845 3850 3855  
 Glu Ser Ser Ser Lys Leu Trp Ala Gln Cys Val Gln Leu His Asn  
 3860 3865 3870  
 Asp Ile Leu Leu Ala Lys Asp Thr Thr Glu Ala Phe Glu Lys Met  
 3875 3880 3885  
 Val Ser Leu Leu Ser Val Leu Leu Ser Met Gln Gly Ala Val Asp  
 3890 3895 3900  
 Ile Asn Arg Leu Cys Glu Glu Met Leu Asp Asn Arg Ala Thr Leu

S226CAS111.ST25  
3915

3905  
 Gln Ala Ile Ala Ser Glu Phe Ser Ser Leu Pro Ser Tyr Ala Ala  
 3920 3925 3930  
 Tyr Ala Thr Ala Gln Glu Ala Tyr Glu Gln Ala Val Ala Asn Gly  
 3935 3940 3945  
 Asp Ser Glu Val Val Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ser Leu Asn Val  
 3950 3955 3960  
 Ala Lys Ser Glu Phe Asp Arg Asp Ala Ala Met Gln Arg Lys Leu  
 3965 3970 3975  
 Glu Lys Met Ala Asp Gln Ala Met Thr Gln Met Tyr Lys Gln Ala  
 3980 3985 3990  
 Arg Ser Glu Asp Lys Arg Ala Lys Val Thr Ser Ala Met Gln Thr  
 3995 4000 4005  
 Met Leu Phe Thr Met Leu Arg Lys Leu Asp Asn Asp Ala Leu Asn  
 4010 4015 4020  
 Asn Ile Ile Asn Asn Ala Arg Asp Gly Cys Val Pro Leu Asn Ile  
 4025 4030 4035  
 Ile Pro Leu Thr Thr Ala Ala Lys Leu Met Val Val Val Pro Asp  
 4040 4045 4050  
 Tyr Gly Thr Tyr Lys Asn Thr Cys Asp Gly Asn Thr Phe Thr Tyr  
 4055 4060 4065  
 Ala Ser Ala Leu Trp Glu Ile Gln Gln Val Val Asp Ala Asp Ser  
 4070 4075 4080  
 Lys Ile Val Gln Leu Ser Glu Ile Asn Met Asp Asn Ser Pro Asn  
 4085 4090 4095  
 Leu Ala Trp Pro Leu Ile Val Thr Ala Leu Arg Ala Asn Ser Ala  
 4100 4105 4110  
 Val Lys Leu Gln Asn Asn Glu Leu Ser Pro Val Ala Leu Arg Gln  
 4115 4120 4125  
 Met Ser Cys Ala Ala Gly Thr Thr Gln Thr Ala Cys Thr Asp Asp  
 4130 4135 4140  
 Asn Ala Leu Ala Tyr Tyr Asn Asn Ser Lys Gly Gly Arg Phe Val  
 4145 4150 4155  
 Leu Ala Leu Leu Ser Asp His Gln Asp Leu Lys Trp Ala Arg Phe

S226CAS111.ST25

4160		4165		4170
Pro Lys Ser Asp Gly Thr	Gly Thr Ile Tyr Thr	Glu Leu Glu Pro		
4175	4180	4185		
Pro Cys Arg Phe Val Thr	Asp Thr Pro Lys Gly	Pro Lys Val Lys		
4190	4195	4200		
Tyr Leu Tyr Phe Ile Lys	Gly Leu Asn Asn Leu	Asn Arg Gly Met		
4205	4210	4215		
Val Leu Gly Ser Leu Ala	Ala Thr Val Arg Leu	Gln Ala Gly Asn		
4220	4225	4230		
Ala Thr Glu Val Pro Ala	Asn Ser Thr Val Leu	Ser Phe Cys Ala		
4235	4240	4245		
Phe Ala Val Asp Pro Ala	Lys Ala Tyr Lys Asp	Tyr Leu Ala Ser		
4250	4255	4260		
Gly Gly Gln Pro Ile Thr	Asn Cys Val Lys Met	Leu Cys Thr His		
4265	4270	4275		
Thr Gly Thr Gly Gln Ala	Ile Thr Val Thr Pro	Glu Ala Asn Met		
4280	4285	4290		
Asp Gln Glu Ser Phe Gly	Gly Ala Ser Cys Cys	Leu Tyr Cys Arg		
4295	4300	4305		
Cys His Ile Asp His Pro	Asn Pro Lys Gly Phe	Cys Asp Leu Lys		
4310	4315	4320		
Gly Lys Tyr Val Gln Ile	Pro Thr Thr Cys Ala	Asn Asp Pro Val		
4325	4330	4335		
Gly Phe Thr Leu Arg Asn	Thr Val Cys Thr Val	Cys Gly Met Trp		
4340	4345	4350		
Lys Gly Tyr Gly Cys Ser	Cys Asp Gln Leu Arg	Glu Pro Leu Met		
4355	4360	4365		
Gln Ser Ala Asp Ala Ser	Thr Phe Leu Asn Gly	Phe Ala Val		
4370	4375	4380		

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 2695

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CORONAVIRUS

S226CAS111.ST25

&lt;400&gt; 75

Arg Val Cys Gly Val Ser Ala Ala Arg Leu Thr Pro Cys Gly Thr Gly  
 1 5 10 15

Thr Ser Thr Asp Val Val Tyr Arg Ala Phe Asp Ile Tyr Asn Glu Lys  
 20 25 30

Val Ala Gly Phe Ala Lys Phe Leu Lys Thr Asn Cys Cys Arg Phe Gln  
 35 40 45

Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Leu Leu Asp Ser Tyr Phe Val Val Lys  
 50 55 60

Arg His Thr Met Ser Asn Tyr Gln His Glu Glu Thr Ile Tyr Asn Leu  
 65 70 75 80

Val Lys Asp Cys Pro Ala Val Ala Val His Asp Phe Phe Lys Phe Arg  
 85 90 95

Val Asp Gly Asp Met Val Pro His Ile Ser Arg Gln Arg Leu Thr Lys  
 100 105 110

Tyr Thr Met Ala Asp Leu Val Tyr Ala Leu Arg His Phe Asp Glu Gly  
 115 120 125

Asn Cys Asp Thr Leu Lys Glu Ile Leu Val Thr Tyr Asn Cys Cys Asp  
 130 135 140

Asp Asp Tyr Phe Asn Lys Lys Asp Trp Tyr Asp Phe Val Glu Asn Pro  
 145 150 155 160

Asp Ile Leu Arg Val Tyr Ala Asn Leu Gly Glu Arg Val Arg Gln Ser  
 165 170 175

Leu Leu Lys Thr Val Gln Phe Cys Asp Ala Met Arg Asp Ala Gly Ile  
 180 185 190

Val Gly Val Leu Thr Leu Asp Asn Gln Asp Leu Asn Gly Asn Trp Tyr  
 195 200 205

Asp Phe Gly Asp Phe Val Gln Val Ala Pro Gly Cys Gly Val Pro Ile  
 210 215 220

Val Asp Ser Tyr Tyr Ser Leu Leu Met Pro Ile Leu Thr Leu Thr Arg  
 225 230 235 240

Ala Leu Ala Ala Glu Ser His Met Asp Ala Asp Leu Ala Lys Pro Leu  
 245 250 255

Ile Lys Trp Asp Leu Leu Lys Tyr Asp Phe Thr Glu Glu Arg Leu Cys  
 Page 106

S226CAS111.ST25

260 265 270

Leu Phe Asp Arg Tyr Phe Lys Tyr Trp Asp Gln Thr Tyr His Pro Asn  
 275 280 285

Cys Ile Asn Cys Leu Asp Asp Arg Cys Ile Leu His Cys Ala Asn Phe  
 290 295 300

Asn Val Leu Phe Ser Thr Val Phe Pro Pro Thr Ser Phe Gly Pro Leu  
 305 310 315 320

Val Arg Lys Ile Phe Val Asp Gly Val Pro Phe Val Val Ser Thr Gly  
 325 330 335

Tyr His Phe Arg Glu Leu Gly Val Val His Asn Gln Asp Val Asn Leu  
 340 345 350

His Ser Ser Arg Leu Ser Phe Lys Glu Leu Leu Val Tyr Ala Ala Asp  
 355 360 365

Pro Ala Met His Ala Ala Ser Gly Asn Leu Leu Leu Asp Lys Arg Thr  
 370 375 380

Thr Cys Phe Ser Val Ala Ala Leu Thr Asn Asn Val Ala Phe Gln Thr  
 385 390 395 400

Val Lys Pro Gly Asn Phe Asn Lys Asp Phe Tyr Asp Phe Ala Val Ser  
 405 410 415

Lys Gly Phe Phe Lys Glu Gly Ser Ser Val Glu Leu Lys His Phe Phe  
 420 425 430

Phe Ala Gln Asp Gly Asn Ala Ala Ile Ser Asp Tyr Asp Tyr Tyr Arg  
 435 440 445

Tyr Asn Leu Pro Thr Met Cys Asp Ile Arg Gln Leu Leu Phe Val Val  
 450 455 460

Glu Val Val Asp Lys Tyr Phe Asp Cys Tyr Asp Gly Gly Cys Ile Asn  
 465 470 475 480

Ala Asn Gln Val Ile Val Asn Asn Leu Asp Lys Ser Ala Gly Phe Pro  
 485 490 495

Phe Asn Lys Trp Gly Lys Ala Arg Leu Tyr Tyr Asp Ser Met Ser Tyr  
 500 505 510

Glu Asp Gln Asp Ala Leu Phe Ala Tyr Thr Lys Arg Asn Val Ile Pro  
 515 520 525

Thr Ile Thr Gln Met Asn Leu Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Lys Asn Arg

S226CAS111.ST25  
540

530

535

Ala Arg Thr Val Ala Gly Val Ser Ile Cys Ser Thr Met Thr Asn Arg  
545 550 555 560Gln Phe His Gln Lys Leu Leu Lys Ser Ile Ala Ala Thr Arg Gly Ala  
565 570 575Thr Val Val Ile Gly Thr Ser Lys Phe Tyr Gly Gly Trp His Asn Met  
580 585 590Leu Lys Thr Val Tyr Ser Asp Val Glu Thr Pro His Leu Met Gly Trp  
595 600 605Asp Tyr Pro Lys Cys Asp Arg Ala Met Pro Asn Met Leu Arg Ile Met  
610 615 620Ala Ser Leu Val Leu Ala Arg Lys His Asn Thr Cys Cys Asn Leu Ser  
625 630 635 640His Arg Phe Tyr Arg Leu Ala Asn Glu Cys Ala Gln Val Leu Ser Glu  
645 650 655Met Val Met Cys Gly Gly Ser Leu Tyr Val Lys Pro Gly Gly Thr Ser  
660 665 670Ser Gly Asp Ala Thr Thr Ala Tyr Ala Asn Ser Val Phe Asn Ile Cys  
675 680 685Gln Ala Val Thr Ala Asn Val Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asp Gly Asn  
690 695 700Lys Ile Ala Asp Lys Tyr Val Arg Asn Leu Gln His Arg Leu Tyr Glu  
705 710 715 720Cys Leu Tyr Arg Asn Arg Asp Val Asp His Glu Phe Val Asp Glu Phe  
725 730 735Tyr Ala Tyr Leu Arg Lys His Phe Ser Met Met Ile Leu Ser Asp Asp  
740 745 750Ala Val Val Cys Tyr Asn Ser Asn Tyr Ala Ala Gln Gly Leu Val Ala  
755 760 765Ser Ile Lys Asn Phe Lys Ala Val Leu Tyr Tyr Gln Asn Asn Val Phe  
770 775 780Met Ser Glu Ala Lys Cys Trp Thr Glu Thr Asp Leu Thr Lys Gly Pro  
785 790 795 800His Glu Phe Cys Ser Gln His Thr Met Leu Val Lys Gln Gly Asp Asp  
Page 108

S226CAS111.ST25  
810

805

815

Tyr Val Tyr Leu Pro Tyr Pro Asp Pro Ser Arg Ile Leu Gly Ala Gly  
 820 825 830  
 Cys Phe Val Asp Asp Ile Val Lys Thr Asp Gly Thr Leu Met Ile Glu  
 835 840 845  
 Arg Phe Val Ser Leu Ala Ile Asp Ala Tyr Pro Leu Thr Lys His Pro  
 850 855 860  
 Asn Gln Glu Tyr Ala Asp Val Phe His Leu Tyr Leu Gln Tyr Ile Arg  
 865 870 875 880  
 Lys Leu His Asp Glu Leu Thr Gly His Met Leu Asp Met Tyr Ser Val  
 885 890 895  
 Met Leu Thr Asn Asp Asn Thr Ser Arg Tyr Trp Glu Pro Glu Phe Tyr  
 900 905 910  
 Glu Ala Met Tyr Thr Pro His Thr Val Leu Gln Ala Val Gly Ala Cys  
 915 920 925  
 Val Leu Cys Asn Ser Gln Thr Ser Leu Arg Cys Gly Ala Cys Ile Arg  
 930 935 940  
 Arg Pro Phe Leu Cys Cys Lys Cys Cys Tyr Asp His Val Ile Ser Thr  
 945 950 955 960  
 Ser His Lys Leu Val Leu Ser Val Asn Pro Tyr Val Cys Asn Ala Pro  
 965 970 975  
 Gly Cys Asp Val Thr Asp Val Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Gly Met Ser  
 980 985 990  
 Tyr Tyr Cys Lys Ser His Lys Pro Pro Ile Ser Phe Pro Leu Cys Ala  
 995 1000 1005  
 Asn Gly Gln Val Phe Gly Leu Tyr Lys Asn Thr Cys Val Gly Ser  
 1010 1015 1020  
 Asp Asn Val Thr Asp Phe Asn Ala Ile Ala Thr Cys Asp Trp Thr  
 1025 1030 1035  
 Asn Ala Gly Asp Tyr Ile Leu Ala Asn Thr Cys Thr Glu Arg Leu  
 1040 1045 1050  
 Lys Leu Phe Ala Ala Glu Thr Leu Lys Ala Thr Glu Glu Thr Phe  
 1055 1060 1065  
 Lys Leu Ser Tyr Gly Ile Ala Thr Val Arg Glu Val Leu Ser Asp  
 Page 109

S226CAS111. ST25

1070					1075					1080			
Arg	Glu	Leu	His	Leu	Ser	Trp	Glu	Val	Gly	Lys	Pro	Arg	Pro
1085						1090					1095		
Leu	Asn	Arg	Asn	Tyr	Val	Phe	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Thr	Lys
1100						1105					1110		Asn
Ser	Lys	Val	Gln	Ile	Gly	Glu	Tyr	Thr	Phe	Glu	Lys	Gly	Asp
1115						1120					1125		Tyr
Gly	Asp	Ala	Val	Val	Tyr	Arg	Gly	Thr	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu
1130						1135					1140		Asn
Val	Gly	Asp	Tyr	Phe	Val	Leu	Thr	Ser	His	Thr	Val	Met	Pro
1145						1150					1155		Leu
Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Val	Pro	Gln	Glu	His	Tyr	Val	Arg	Ile
1160						1165					1170		Thr
Gly	Leu	Tyr	Pro	Thr	Leu	Asn	Ile	Ser	Asp	Glu	Phe	Ser	Ser
1175						1180					1185		Asn
Val	Ala	Asn	Tyr	Gln	Lys	Val	Gly	Met	Gln	Lys	Tyr	Ser	Thr
1190						1195					1200		Leu
Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Thr	Gly	Lys	Ser	His	Phe	Ala	Ile	Gly
1205						1210					1215		Leu
Ala	Leu	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Ala	Arg	Ile	Val	Tyr	Thr	Ala	Cys
1220						1225					1230		Ser
His	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Leu	Cys	Glu	Lys	Ala	Leu	Lys	Tyr
1235						1240					1245		Leu
Pro	Ile	Asp	Lys	Cys	Ser	Arg	Ile	Ile	Pro	Ala	Arg	Ala	Arg
1250						1255					1260		Val
Glu	Cys	Phe	Asp	Lys	Phe	Lys	Val	Asn	Ser	Thr	Leu	Glu	Gln
1265						1270					1275		Tyr
Val	Phe	Cys	Thr	Val	Asn	Ala	Leu	Pro	Glu	Thr	Thr	Ala	Asp
1280						1285					1290		Ile
Val	Val	Phe	Asp	Glu	Ile	Ser	Met	Ala	Thr	Asn	Tyr	Asp	Leu
1295						1300					1305		Ser
Val	Val	Asn	Ala	Arg	Leu	Arg	Ala	Lys	His	Tyr	Val	Tyr	Ile
1310						1315					1320		Gly
Asp	Pro	Ala	Gln	Leu	Pro	Ala	Pro	Arg	Thr	Leu	Leu	Thr	Lys
													Gly



S226CAS111.ST25

1325						1330						1335
Thr	Leu	Glu	Pro	Glu	Tyr	Phe	Asn	Ser	Val	Cys	Arg	Leu
1340						1345					1350	Met Lys
Thr	Ile	Gly	Pro	Asp	Met	Phe	Leu	Gly	Thr	Cys	Arg	Arg
1355						1360					1365	Cys Pro
Ala	Glu	Ile	Val	Asp	Thr	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Tyr	Asp
1370						1375					1380	Asn Lys
Leu	Lys	Ala	His	Lys	Asp	Lys	Ser	Ala	Gln	Cys	Phe	Lys
1385						1390					1395	Met Phe
Tyr	Lys	Gly	Val	Ile	Thr	His	Asp	Val	Ser	Ser	Ala	Ile
1400						1405					1410	Asn Arg
Pro	Gln	Ile	Gly	Val	Val	Arg	Glu	Phe	Leu	Thr	Arg	Asn
1415						1420					1425	Pro Ala
Trp	Arg	Lys	Ala	Val	Phe	Ile	Ser	Pro	Tyr	Asn	Ser	Gln
1430						1435					1440	Asn Ala
Val	Ala	Ser	Lys	Ile	Leu	Gly	Leu	Pro	Thr	Gln	Thr	Val
1445						1450					1455	Asp Ser
Ser	Gln	Gly	Ser	Glu	Tyr	Asp	Tyr	Val	Ile	Phe	Thr	Gln
1460						1465					1470	Thr Thr
Glu	Thr	Ala	His	Ser	Cys	Asn	Val	Asn	Arg	Phe	Asn	Val
1475						1480					1485	Ala Ile
Thr	Arg	Ala	Lys	Ile	Gly	Ile	Leu	Cys	Ile	Met	Ser	Asp
1490						1495					1500	Arg Asp
Leu	Tyr	Asp	Lys	Leu	Gln	Phe	Thr	Ser	Leu	Glu	Ile	Pro
1505						1510					1515	Arg Arg
Asn	Val	Ala	Thr	Leu	Gln	Ala	Glu	Asn	Val	Thr	Gly	Leu
1520						1525					1530	Phe Lys
Asp	Cys	Ser	Lys	Ile	Ile	Thr	Gly	Leu	His	Pro	Thr	Gln
1535						1540					1545	Ala Pro
Thr	His	Leu	Ser	Val	Asp	Ile	Lys	Phe	Lys	Thr	Glu	Gly
1550						1555					1560	Leu Cys
Val	Asp	Ile	Pro	Gly	Ile	Pro	Lys	Asp	Met	Thr	Tyr	Arg
1565						1570					1575	Arg Leu
Ile	Ser	Met	Met	Gly	Phe	Lys	Met	Asn	Tyr	Gln	Val	Asn
												Gly Tyr

S226CAS111.ST25

1580		1585		1590	
Pro Asn Met Phe Ile Thr Arg	Glu Glu Ala Ile Arg	His Val Arg			
1595	1600	1605			
Ala Trp Ile Gly Phe Asp Val	Glu Gly Cys His Ala	Thr Arg Asp			
1610	1615	1620			
Ala Val Gly Thr Asn Leu Pro	Leu Gln Leu Gly Phe	Ser Thr Gly			
1625	1630	1635			
Val Asn Leu Val Ala Val Pro	Thr Gly Tyr Val Asp	Thr Glu Asn			
1640	1645	1650			
Asn Thr Glu Phe Thr Arg Val	Asn Ala Lys Pro Pro	Pro Gly Asp			
1655	1660	1665			
Gln Phe Lys His Leu Ile Pro	Leu Met Tyr Lys Gly	Leu Pro Trp			
1670	1675	1680			
Asn Val Val Arg Ile Lys Ile	Val Gln Met Leu Ser	Asp Thr Leu			
1685	1690	1695			
Lys Gly Leu Ser Asp Arg Val	Val Phe Val Leu Trp	Ala His Gly			
1700	1705	1710			
Phe Glu Leu Thr Ser Met Lys	Tyr Phe Val Lys Ile	Gly Pro Glu			
1715	1720	1725			
Arg Thr Cys Cys Leu Cys Asp	Lys Arg Ala Thr Cys	Phe Ser Thr			
1730	1735	1740			
Ser Ser Asp Thr Tyr Ala Cys	Trp Asn His Ser Val	Gly Phe Asp			
1745	1750	1755			
Tyr Val Tyr Asn Pro Phe Met	Ile Asp Val Gln Gln	Trp Gly Phe			
1760	1765	1770			
Thr Gly Asn Leu Gln Ser Asn	His Asp Gln His Cys	Gln Val His			
1775	1780	1785			
Gly Asn Ala His Val Ala Ser	Cys Asp Ala Ile Met	Thr Arg Cys			
1790	1795	1800			
Leu Ala Val His Glu Cys Phe	Val Lys Arg Val Asp	Trp Ser Val			
1805	1810	1815			
Glu Tyr Pro Ile Ile Gly Asp	Glu Leu Arg Val Asn	Ser Ala Cys			
1820	1825	1830			
Arg Lys Val Gln His Met Val	Val Lys Ser Ala Leu	Leu Ala Asp			

## S226CAS111.ST25

1835		1840		1845	
Lys Phe Pro Val Leu His Asp Ile Gly Asn Pro Lys Ala Ile Lys	1850	1855	1860		
Cys Val Pro Gln Ala Glu Val Glu Trp Lys Phe Tyr Asp Ala Gln	1865	1870	1875		
Pro Cys Ser Asp Lys Ala Tyr Lys Ile Glu Glu Leu Phe Tyr Ser	1880	1885	1890		
Tyr Ala Thr His His Asp Lys Phe Thr Asp Gly Val Cys Leu Phe	1895	1900	1905		
Trp Asn Cys Asn Val Asp Arg Tyr Pro Ala Asn Ala Ile Val Cys	1910	1915	1920		
Arg Phe Asp Thr Arg Val Leu Ser Asn Leu Asn Leu Pro Gly Cys	1925	1930	1935		
Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Val Asn Lys His Ala Phe His Thr Pro	1940	1945	1950		
Ala Phe Asp Lys Ser Ala Phe Thr Asn Leu Lys Gln Leu Pro Phe	1955	1960	1965		
Phe Tyr Tyr Ser Asp Ser Pro Cys Glu Ser His Gly Lys Gln Val	1970	1975	1980		
Val Ser Asp Ile Asp Tyr Val Pro Leu Lys Ser Ala Thr Cys Ile	1985	1990	1995		
Thr Arg Cys Asn Leu Gly Gly Ala Val Cys Arg His His Ala Asn	2000	2005	2010		
Glu Tyr Arg Gln Tyr Leu Asp Ala Tyr Asn Met Met Ile Ser Ala	2015	2020	2025		
Gly Phe Ser Leu Trp Ile Tyr Lys Gln Phe Asp Thr Tyr Asn Leu	2030	2035	2040		
Trp Asn Thr Phe Thr Arg Leu Gln Ser Leu Glu Asn Val Ala Tyr	2045	2050	2055		
Asn Val Val Asn Lys Gly His Phe Asp Gly His Ala Gly Glu Ala	2060	2065	2070		
Pro Val Ser Ile Ile Asn Asn Ala Val Tyr Thr Lys Val Asp Gly	2075	2080	2085		
Ile Asp Val Glu Ile Phe Glu Asn Lys Thr Thr Leu Pro Val Asn					

2095

2100

Page 114

S226CAS111.ST25

2345                      2350                      2355  
 Ser Gln Asp Leu Ser Val Ile Ser Lys Val Val Lys Val Thr Ile  
 2360                      2365                      2370  
 Asp Tyr Ala Glu Ile Ser Phe Met Leu Trp Cys Lys Asp Gly His  
 2375                      2380                      2385  
 Val Glu Thr Phe Tyr Pro Lys Leu Gln Ala Ser Gln Ala Trp Gln  
 2390                      2395                      2400  
 Pro Gly Val Ala Met Pro Asn Leu Tyr Lys Met Gln Arg Met Leu  
 2405                      2410                      2415  
 Leu Glu Lys Cys Asp Leu Gln Asn Tyr Gly Glu Asn Ala Val Ile  
 2420                      2425                      2430  
 Pro Lys Gly Ile Met Met Asn Val Ala Lys Tyr Thr Gln Leu Cys  
 2435                      2440                      2445  
 Gln Tyr Leu Asn Thr Leu Thr Leu Ala Val Pro Tyr Asn Met Arg  
 2450                      2455                      2460  
 Val Ile His Phe Gly Ala Gly Ser Asp Lys Gly Val Ala Pro Gly  
 2465                      2470                      2475  
 Thr Ala Val Leu Arg Gln Trp Leu Pro Thr Gly Thr Leu Leu Val  
 2480                      2485                      2490  
 Asp Ser Asp Leu Asn Asp Phe Val Ser Asp Ala Asp Ser Thr Leu  
 2495                      2500                      2505  
 Ile Gly Asp Cys Ala Thr Val His Thr Ala Asn Lys Trp Asp Leu  
 2510                      2515                      2520  
 Ile Ile Ser Asp Met Tyr Asp Pro Arg Thr Lys His Val Thr Lys  
 2525                      2530                      2535  
 Glu Asn Asp Ser Lys Glu Gly Phe Phe Thr Tyr Leu Cys Gly Phe  
 2540                      2545                      2550  
 Ile Lys Gln Lys Leu Ala Leu Gly Gly Ser Ile Ala Val Lys Ile  
 2555                      2560                      2565  
 Thr Glu His Ser Trp Asn Ala Asp Leu Tyr Lys Leu Met Gly His  
 2570                      2575                      2580  
 Phe Ser Trp Trp Thr Ala Phe Val Thr Asn Val Asn Ala Ser Ser  
 2585                      2590                      2595  
 Ser Glu Ala Phe Leu Ile Gly Ala Asn Tyr Leu Gly Lys Pro Lys  
 Page 115

S226CAS111.ST25

2600

2605

2610

Glu Gln Ile Asp Gly Tyr Thr Met His Ala Asn Tyr Ile Phe Trp  
 2615 2620 2625

Arg Asn Thr Asn Pro Ile Gln Leu Ser Ser Tyr Ser Leu Phe Asp  
 2630 2635 2640

Met Ser Lys Phe Pro Leu Lys Leu Arg Gly Thr Ala Val Met Ser  
 2645 2650 2655

Leu Lys Glu Asn Gln Ile Asn Asp Met Ile Tyr Ser Leu Leu Glu  
 2660 2665 2670

Lys Gly Arg Leu Ile Ile Arg Glu Asn Asn Arg Val Val Val Ser  
 2675 2680 2685

Ser Asp Ile Leu Val Asn Asn  
 2690 2695

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L3/+/4932

<400> 76  
 ccacacacag cttgtggata

20

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L4/+/6401

<400> 77  
 ccgaagttgt aggcaatgtc

20

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

S226CAS111. ST25

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L4/+/6964

&lt;400&gt; 78

tttggtgctc cttcttattg

20

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L4/-/6817

&lt;400&gt; 79

ccggcatcca aacataattt

20

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L5/-/7633

&lt;400&gt; 80

tggtcagtag gggttgattgg

20

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; S/L5/-/8127

&lt;400&gt; 81

catcctttgt gtcaacatcg

20

&lt;210&gt; 82

S226CAS111.ST25

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L5/-/8633

&lt;400&gt; 82

gtcacgagtg acaccatcct

20

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L5+/7839

&lt;400&gt; 83

atgcgacgag tctgcttcta

20

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L5+/8785

&lt;400&gt; 84

ttcatagtgc ctggcttacc

20

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L5+/8255

&lt;400&gt; 85



atcttggcgc atgtattgac S226CAS111.ST25 20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L6/-/9422

<400> 86

tgcatatgca gcaacaacat

20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L6/-/9966

<400> 87

tctgcagaac agcagaagtg

20

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L6/-/10542

<400> 88

cctgtgcagt ttgtctgtca

20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

## S226CAS111.ST25

<223> amorce S/L6/+/10677

<400> 89

ccttgtggca atgaagtaca

20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L6/+/10106

<400> 90

atgtcatttg cacagcagaa

20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L6/+/9571

<400> 91

cttcaatggg ttgccatgtt

20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L7/-/11271

<400> 92

tgcgagctgt catgagaata

20

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

S226CAS111.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L7/-/11801

&lt;400&gt; 93

aaccgagagc agtaccacag

20

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L7/-/12383

&lt;400&gt; 94

tttggctgct gtagtcaatg

20

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L7/+/12640

&lt;400&gt; 95

ctacgacaga tgcctgtgc

20

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L7/+/12088

&lt;400&gt; 96

gagcaggctg tagctaattg

20

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 20

S226CAS111.ST25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L7/+/11551

&lt;400&gt; 97

ttaggctatt gttgctgctg

20

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L8/-/13160

&lt;400&gt; 98

cagacaacat gaagcaccac

20

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L8/-/13704

&lt;400&gt; 99

cgctgacgtg atatatgtgg

20

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L8/-/14284

&lt;400&gt; 100

tgcacaatga aggatacacc

20

## S226CAS111.ST25

<210> 101  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L8/+/14453

<400> 101  
acatagctcg cgtctcagtt

20

<210> 102  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L8/+/13968

<400> 102  
ggcattgtag gcgtactgac

20

<210> 103  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L8/+/13401

<400> 103  
gtttgcggtg taagtgcag

19

<210> 104  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce S/L9/-/15098

S226CAS111.ST25

<400> 104  
tagtggcggc tattgacttc 20

<210> 105  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce S/L9/-/15677

<400> 105  
ctaaaccttg agccgcatag 20

<210> 106  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce S/L9/-/16247

<400> 106  
catggtcata gcagcacttg 20

<210> 107  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce S/L9+/16323

<400> 107  
ccaggttg atgtcactga t 21

<210> 108  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

S226CAS111.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L9/+/15858

&lt;400&gt; 108

ccttaccag atccatcaag

20

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L9/+/15288

&lt;400&gt; 109

cgcaaacata acacttgctg

20

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L10/-/16914

&lt;400&gt; 110

agtgttgggt acaagccagt

20

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L10/-/17466

&lt;400&gt; 111

gttccaagga acatgtctgg

20

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

S226CAS111.ST25

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L10/-/18022

<400> 112  
aggtgcctgt gtaggatgaa

20

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L10+/18245

<400> 113  
gggctgtcat gcaactagag

20

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L10+/17663

<400> 114  
tcttacacgc aatcctgctt

20

&lt;210&gt; 115

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce S/L10+/17061

<400> 115  
taccatctg ctcgcatagt

20

&lt;210&gt; 116



S226CAS111.ST25

<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce S/L11/-/18877

<400> 116  
gcaagcagaa ttaaccctca 20

<210> 117  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce S/L11/-/19396

<400> 117  
agcaccacct aaattgcatc 20

<210> 118  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce S/L11/-/20002

<400> 118  
tggtcccttt gaaggtgtta 20

<210> 119  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce S/L11/+ /20245

<400> 119

tcgaacacat cgtttatgga S226CAS111.ST25 20

<210> 120  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce S/L11/+ /19611  
<400> 120  
gaagcacctg tttccatcat 20

<210> 121  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce S/L11/+ /19021  
<400> 121  
acgatgctca gccatgtagt 20

<210> 122  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce SARS/L1/F3/+ /800  
<400> 122  
gaggtgcagt cactcgctat 20

<210> 123  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

S226CAS111.ST25

&lt;223&gt; amorce SARS/L1/F4/+ /1391

&lt;400&gt; 123

cagagattgg acctgagcat

20

&lt;210&gt; 124

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L1/F5/+ /1925

&lt;400&gt; 124

cagcaaacca ctcaattcct

20

&lt;210&gt; 125

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L1/R3/- /1674

&lt;400&gt; 125

aaatgatggc aacctcttca

20

&lt;210&gt; 126

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L1/R4/- /1107

&lt;400&gt; 126

cacgtggttg aatgactttg

20

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

S226CAS111.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L1/R5/-/520

&lt;400&gt; 127

atttctgcaa ccagctcaac

20

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L2/F3/+ /2664

&lt;400&gt; 128

cgcattgtct cctgggtttac

20

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L2/F4/+ /3232

&lt;400&gt; 129

gagattgagc cagaaccaga

20

&lt;210&gt; 130

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L2/F5/+ /3746

&lt;400&gt; 130

atgagcagggt tgtcatggat

20

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 20

S226CAS111.ST25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L2/R3/-/3579

&lt;400&gt; 131

ctgccttaag aagctggatg

20

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L2/R4/-/2991

&lt;400&gt; 132

tttcttcacc agcatcatca

20

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L2/R5/-/2529

&lt;400&gt; 133

caccgttctt gagaacaacc

20

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L3/F3/+ /4708

&lt;400&gt; 134

tctttggctg gctcttacag

20

S226CAS111 .ST25

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SRAS/L3/F4/+/5305

&lt;400&gt; 135

gctggtgatg ctgctaactt

20

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L3/F5/+/5822

&lt;400&gt; 136

ccatcaagcc tgtgtcgtat

20

&lt;210&gt; 137

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L3/R3/-/5610

&lt;400&gt; 137

caggtggtgc agacatcata

20

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SARS/L3/R4/-/4988

## S226CAS111.ST25

<400> 138  
aacatcagca ccatccaagt 20

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce SARS/L3/R5/-/4437

<400> 139  
atcggacacc atagtcaacg 20

<210> 140

<211> 7788

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> gène S synthétique

<400> 140  
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60  
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120  
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttag taatagtaat caattacggg 180  
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcggtaca taacttacgg taaatggccc 240  
gcctggctga ccgcccacg acccccggc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300  
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaaactgc 360  
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga 420  
cggtaaatgg ccgacctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480  
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac 540  
caatggggtt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600  
caatggggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc 660  
cgccccgttg acgcaaattg gcggtagggc tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720  
tcgttttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgctg gtagtttatc acagttaaatt 780  
tgctaacgca gtcagtgtt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggctc 840  
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900

S226CAS111.ST25

actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcaccta	ttggtcttac	960
tgacatccac	tttgcccttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctagcgga	tccaccatgt	tcattcttcct	1080
gctgttcctg	accctgacca	gcggcagcga	cctggaccgg	tgcaccacct	tcgacgacgt	1140
gcaggccccc	aactacaccc	agcacaccag	cagcatgcgg	ggcgtgtact	accccagcga	1200
gatctttcgg	agcgacaccc	tgtacctgac	ccaggacctg	ttcctgccct	tctacagcaa	1260
cgtgaccggc	ttccacacca	tcaaccacac	cttcggcaac	cccgtgatcc	ccttcaagga	1320
cggcattctac	ttcgccgcca	ccgagaagag	caacgtggtg	cggggctggg	tggttcggcag	1380
caccatgaac	aacaagagcc	agagcgtgat	catcatcaac	aacagcacca	acgtggtgat	1440
ccgggcctgc	aacttcgagc	tgtgcgacaa	ccccttcttc	gccgtgtcca	aacccatggg	1500
caccagacc	cacaccatga	tcttcgacaa	cgctttcaac	tgacacctcg	agtacatcag	1560
cgacgccttc	agcctggacg	tgagcgagaa	gagcggcaac	ttcaagcacc	tgcgggagtt	1620
cgtgttcaag	aacaaggacg	gcttcctgta	cgtgtacaag	ggctaccagc	ccatcgacgt	1680
ggtgagagac	ctgcccagcg	gcttcaacac	cctgaagccc	atcttcaagc	tgcccctggg	1740
catcaacatc	accaacttcc	gggccatcct	gaccgccttt	agccctgccc	aggacatctg	1800
gggcaccagc	gccgccgcct	acttcgtggg	ctacctgaag	cctaccacct	tcattgctgaa	1860
gtacgacgag	aacggcacca	tcaccgacgc	cgtggactgc	agccagaacc	ccctggccga	1920
gctgaagtgc	agcgtgaaga	gcttcgagat	cgacaagggc	atctaccaga	ccagcaactt	1980
cagagtgggtg	cctagcggcg	atgtggtgcg	gttccccaat	atcaccaacc	tgtgcccctt	2040
cggcgaagtg	ttcaacgcca	ccaagtctcc	cagcgtgtac	gcctgggagc	ggaagaagat	2100
cagcaactgc	gtggccgact	acagcgtgct	gtacaactcc	accttcttca	gcaccttcaa	2160
gtgctacggc	gtgagcgcca	ccaagctgaa	cgacctgtgc	ttcagcaacg	tgtacgccga	2220
cagcttcgtg	gtgaagggcg	acgacgtgag	acagatcgcc	cctggccaga	ccggcgtgat	2280
cgccgactac	aactacaagc	tgcccagcga	cttcatgggc	tgctgtctgg	cctggaacac	2340
ccggaacatc	gacgccacaa	gcaccggcaa	ctacaattac	aagtaccgct	acctgcggca	2400
cggcaagctg	cggcccttcg	agcgggacat	ctccaacgtg	cccttcagcc	ccgacggcaa	2460
gccctgcacc	ccccctgccc	tgaactgcta	ctggcccctg	aacgactacg	gcttctacac	2520
caccaccggc	atcggtatc	agccctacag	agtgggtggg	ctgagcttcg	agctgctgaa	2580
cgcccctgcc	accgtgtgcg	gccccaaagt	gagcaccgac	ctgatcaaga	accagtgcgt	2640
gaacttcaac	ttcaacggcc	tgaccggcac	cggcgtgctg	acccccagca	gcaagcgctt	2700
ccagcccttc	cagcagttcg	gccgggatgt	gagcgacttc	accgacagcg	tgcgggaccc	2760
caagaccagc	gagatcctgg	acatcagccc	ctgcagcttc	ggcggcgtgt	ccgtgatcac	2820
ccccggcacc	aacgccagca	gcgaagtggc	cgtgctgtac	caggacgtga	actgcaccga	2880
cgtgagcacc	gccatccacg	ccgaccagct	gacccccgcc	tggcggatct	acagcaccgg	2940



S226CAS111.ST25

gaacaacgtg	ttccagaccc	aggccggctg	cctgatcggc	gccgagcacg	tggacaccag	3000
ctacgagtgc	gacatcccca	ttggcgccgg	aatctgcgcc	agctaccaca	ccgtgagcct	3060
gctgcggagc	accagccaga	agtccatcgt	ggcctacacc	atgagcctgg	gcgccgacag	3120
cagcatcgcc	tacagcaaca	acaccatcgc	catccccacc	aacttcagca	tctccatcac	3180
caccgaagtg	atgcccgctga	gcatggccaa	gacaagcgtg	gattgcaaca	tgtacatctg	3240
cggcgacagc	accgagtgcg	ccaacctgct	gctgcagtac	ggcagcttct	gcacccagct	3300
gaaccggggc	ctgagcggca	tcgccgccga	gcaggaccgg	aacaccagag	aagtgttcgc	3360
ccaagtgaag	cagatgtata	agacccccac	cctgaagtac	ttcgggggct	tcaacttctc	3420
tcagatcctg	cccgaccctc	tgaagcccac	caagcgctcc	ttcatcgagg	acctgctggt	3480
caacaaagtg	accctggccg	acgccggctt	tatgaagcag	tacggcgagt	gcctgggcga	3540
catcaacgcc	cgggacctga	tctgcgcccc	gaagttaaac	gggctgaccg	tgctgcccc	3600
cctgctgacc	gacgacatga	tcgccgccta	tacagccgcc	ctggtgagcg	gcaccgccac	3660
cgccggctgg	accttcggag	ccggagccgc	cctgcagatc	cccttcgcca	tgcatatggc	3720
ctaccggttc	aacggcatcg	gcgtgacca	gaacgtgctg	tacgagaacc	agaagcagat	3780
cgccaaccag	ttcaacaagg	ccatcagcca	gatccaggag	agcctgacca	caaccagcac	3840
cgccctgggc	aagctgcagg	acgtggtgaa	ccagaacgcc	caggccctga	acaccttggt	3900
gaagcagctg	agcagcaact	tcggcgccat	cagctctgtg	ctgaacgaca	tcctgagcag	3960
gctggacaaa	gtggaggccg	aagtgcagat	cgaccggctg	atcaccggac	gcctgcagtc	4020
cctgcagacc	tacgtgaccc	agcagctgat	cagagccgcc	gagatccggg	ccagcgccaa	4080
tctggccgcc	accaagatga	gcgagtgcgt	gctggggccag	agcaagagag	tggacttctg	4140
cggcaagggc	tatcacctga	tgagcttccc	ccaggccgcc	ccccacggcg	tggtgttcct	4200
gcacgtgacc	tacgtgccta	gccaggagcg	gaacttcacc	accgccccag	ccatctgcca	4260
cgagggcaag	gcctacttcc	cccgggaggg	cgtgttcgtg	tttaacggca	ccagctgggt	4320
catcaccag	cgcaacttct	tcagccccca	gatcatcacc	acagacaaca	ccttcgtgtc	4380
cggcaactgt	gatgtggtga	tcggcatcat	caataacacc	gtgtacgacc	ccctgcagcc	4440
cgagctggac	agcttcaagg	aggagctgga	caaatacttc	aagaaccaca	cctccccga	4500
cgtggacctg	ggcgatatca	gcggcaccaa	cgcctccgtg	gtgaacatcc	agaaggagat	4560
cgacagactg	aacgaagtgg	ccaagaacct	gaacgagagc	ctgatcgacc	tgaggagct	4620
gggcaagtac	gagcagtaca	tcaagtggcc	ctggtacgtg	tggctgggct	tcatcgccgg	4680
cctgatcgcc	atcgtgatgg	tgaccatcct	gctgtgctgc	atgaccagct	gctgtagctg	4740
cctgaaaggc	gcctgcagct	gtggcagctg	ctgcaagttc	gacgaggacg	acagcgagcc	4800
cgtgctgaag	ggcgtgaagc	tgcactacac	ctgataactc	gagaattcac	gcgtgggtacc	4860
tctagagtcg	acccgggcgg	ccgcttcgag	cagacatgat	aagatacatt	gatgagtttg	4920
gacaaaccac	aactagaatg	cagtgaaaaa	aatgctttat	ttgtgaaatt	tgtgatgcta	4980

S226CAS111.ST25

ttgcttttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc	5040
attttatgtt tcagggttcag ggggagatgt gggagggtttt ttaaagcaag taaaacctct	5100
acaaatgtgg taaaatcgat aaggatccgg gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg	5160
atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gacgcgccct gtagcggcgc	5220
attaagcgcg gcggggtgtg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct	5280
agcgcgccgt ccttttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg	5340
tcaagctcta aatcgggggc tcccttttag gttccgattt agagctttac ggcacctcga	5400
ccgcaaaaaa cttgatttgg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg	5460
ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg	5520
aacaacactc aaccctatct cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc	5580
ggcctatttg ttaaaaaatg agctgattta acaaatatth aacgcgaatt ttaacaaaat	5640
attaacgttt acaatttcgc ctgatgcggg attttctcct tacgcatctg tgcgggtattt	5700
cacaccgcat atggtgcact ctcatgaca tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc	5760
cccgcacccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg	5820
cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat	5880
caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg tgatacgccct atttttatag gttaatgtca	5940
tgataataat ggtttcttag acgtcagggt gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc	6000
ctattttgtt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct	6060
gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg	6120
cccttatttc cttttttgcg gcatttttgc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg	6180
tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc	6240
tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca	6300
cttttaaagt tctgctatgt ggcgcgggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac	6360
tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa	6420
agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg	6480
ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt	6540
ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg	6600
aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc	6660
gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga	6720
tgagggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ctttccggct ggctggttta	6780
ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gactggggc	6840
cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg	6900
atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggttaactgt	6960
cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa	7020

S226CAS111.ST25

```

ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 7080
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 7140
ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaca aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 7200
tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 7260
taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 7320
caccgcctac atacctcgct ctgctaatacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 7380
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 7440
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 7500
gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 7560
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 7620
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 7680
tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 7740
ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatggctcg acagatct 7788

```

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SNE-S1

&lt;400&gt; 141

ggttgggatt atccaaaatg tga

23

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce SNE-AS1

&lt;400&gt; 142

gcatcatcag aaagaatcat catg

24

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

## S226CAS111.ST25

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce SAR1-S

<400> 143  
cctctcttgt tcttgctcgc a 21

<210> 144

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce SAR1-AS

<400> 144  
tatagtgagc cgccacacat g 21

<210> 145

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 145  
ataggatcca ccatgtttat tttcttatta tttcttactc tcact 45

<210> 146

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 146  
atactcgcagt tatgtgtaat gtaatttgac acccttg 37

<210> 147

## S226CAS111.ST25

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce PCR

&lt;400&gt; 147

ataggatcca ccatgtttat tttcttatta tttcttactc tcact

45

&lt;210&gt; 148

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce PCR

&lt;400&gt; 148

acctccggat ttaatatatt gtcatatatt tcccaa

36

&lt;210&gt; 149

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> extrémité N-terminale de la protéine S du SRAS-CoV (acides amines  
1 à 13)

&lt;400&gt; 149

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly  
1 5 10

&lt;210&gt; 150

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

S226CAS111.ST25

&lt;223&gt; oligopeptide

&lt;400&gt; 150

Ser Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 151

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce PCR

&lt;400&gt; 151

actagctagc ggatccacca tggtcatctt cctg

34

&lt;210&gt; 152

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce PCR

&lt;400&gt; 152

agtatccgga cttgatgtac tgctcgact tgc

33

&lt;210&gt; 153

&lt;211&gt; 59

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; oligonuc1éotide

&lt;400&gt; 153

tatgagcttt tttttttttt tttttttggc atataaatag actcggcgcg ccatctgca

59

&lt;210&gt; 154

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; DNA

S226CAS111.ST25

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; oligonucléotide

&lt;400&gt; 154

gatggcgcgc cgagtctatt tatatgccaa aaaaaaaaaa aaaaaaaagc tca

53

&lt;210&gt; 155

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce PCR

&lt;400&gt; 155

atacgtacga ccatgtttat tttcttatta tttcttactc tcact

45

&lt;210&gt; 156

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce PCR

&lt;400&gt; 156

atagcgcgct cattatgtgt aatgtaattt gacacccttg

40

&lt;210&gt; 157

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce PCR

&lt;400&gt; 157

ccatttcaac aatttgccg

20

&lt;210&gt; 158

S226CAS111.ST25

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce PCR

&lt;400&gt; 158

ataggatccg cgcgctcatt atttatcgtc gtcattcttta taatc

45



## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N7/00 C07K14/165 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	DATABASE UNIPROT 10 October 2003 (2003-10-10), XP002294755 Database accession no. P59594 the whole document	1-5,7,8, 11-31
X	MARRA M A ET AL: "The genome sequence of the SARS-associated coronavirus" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 300, no. 5624, 30 May 2003 (2003-05-30), pages 1399-1404, XP002269483 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-5,7,8, 11-31

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 May 2005

Date of mailing of the international search report

06/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chavanne, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/003105

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WANG J ET AL: "ASSESSMENT OF IMMUNOREACTIVE SYNTHETIC PEPTIDES FROM THE STRUCTURAL PROTEINS OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON, US, vol. 49, no. 12, 13 November 2003 (2003-11-13), pages 1989-1996, XP001182489 ISSN: 0009-9147 the whole document</p> <p>-----</p>	1-31

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 7 C12N7/00 C07K14/165 G01N33/569

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
X	DATABASE UNIPROT 10 octobre 2003 (2003-10-10), XP002294755 Database accession no. P59594 le document en entier	1-5,7,8, 11-31
X	MARRA M A ET AL: "The genome sequence of the SARS-associated coronavirus" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 300, no. 5624, 30 mai 2003 (2003-05-30), pages 1399-1404, XP002269483 ISSN: 0036-8075 le document en entier	1-5,7,8, 11-31

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe**\* Catégories spéciales de documents cités.**

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*G\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 mai 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/06/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chavanne, F

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
X	<p>WANG J ET AL: "ASSESSMENT OF IMMUNOREACTIVE SYNTHETIC PEPTIDES FROM THE STRUCTURAL PROTEINS OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON, US, vol. 49, no. 12, 13 novembre 2003 (2003-11-13), pages 1989-1996, XP001182489 ISSN: 0009-9147 le document en entier -----</p>	1-31